Instytut Agrofizyki
im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
w Lublinie

ACTA AGROPHYSICA

61

Antoni Murkowski

ODDZIAŁYWANIE CZYNNIKÓW STRESOWYCH NA LUMINESCENCJĘ CHLOROFILU W APARACIE FOTOSYNTETYCZNYM ROŚLIN UPRAWNYCH

INSTYTUT AGROFIZYKI BIBLIOTEKA w Lublinie

Monografia

Lublin 2002

Komitet Redakcyjny

Redaktor Naczelny - prof. dr hab. Jan Gliński, czł. koresp. PAN

Z-cy Redaktora Naczelnego:
prof. dr hab. Ryszard T. Walczak, czł. koresp. PAN - fizyka środowiska
prof. dr hab. Bogusław Szot - fizyka materiałów roślinnych
prof. dr hab. Ryszard Dębicki - gleboznawstwo

Rada Redakcyjna

prof. dr hab. J. Haman, czł. rzecz. PAN - przewodniczący

prof. dr hab. T. Brandyk
prof. dr hab. I. Dechnik
prof. dr hab. D. Drozd
prof. dr hab. F. Dubert
prof. dr hab. J. Fornal
prof. dr hab. E. Kamiński
prof. dr hab. A. Kędziora
prof. dr hab. T. Kęsik
prof. dr hab. Cz. Koźmiński
prof. dr hab. J. Laskowski
prof. dr hab. P.P. Lewicki
prof. dr hab. S. Nawrocki, czł. rzecz. PAN
prof. dr hab. E. Niedźwiecki
prof. dr hab. J. Sielewiesiuk
prof. dr hab. W. Stępniewski
prof. dr hab. Z. Ślipek
prof. dr hab. S. Zawadzki, czł. rzecz. PAN

Redaktor tomu

dr Antoni Murkowski

Opiniowali do druku

prof. dr hab. Tadeusz Łoboda
prof. dr hab. Jan Sielewiesiuk

Adres redakcji

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, P.O. Box 201
20-290 Lublin 27, tel. (0-81) 744-50-61, e-mail: editor@demeter.ipan.lublin.pl
http: //www.ipan.lublin.pl

Publikacja indeksowana przez
Polish Scientific Journals Contents - Agric. & Biol. Sci. w sieci Internet
pod adresem http://psjc.icm.edu.pl

© Copyright by Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin 2002

Pracę częściowo wykonano w ramach projektu badawczego Nr 3 POGA 022 22
finansowanego przez Komitet Badań Naukowych

ISSN 1234 - 4125

Wydanie I. Nakład 170 egz. Ark. wyd. 11,9
Skład komputerowy: dr Wanda Woźniak
Druk: Zakład Usług Poligraficznych TEKST s.c., ul. Wspólna 19, 20-344 Lublin

SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY 6
1. WSTĘP I CEL PRACY 7
2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA 9
2.1. Biofizyczne aspekty procesu fotosyntezy i luminescencja chlorofilu 9
2.1.1. Etapy konwersji energii fotonów PAR w procesie fotosyntezy 9
2.1.2. Fluorescencja chlorofilu oraz opóźniona luminescencja chlorofilu .. 18
2.2. Oddziaływanie czynników stresowych na rośliny uprawne 23
2.2.1. Czynniki klimatyczne 23
2.2.2. Niedobór azotu 28
2.2.3. Herbicydy – inhibitory fotosyntezy 30
2.2.4. Fotoinhibicja i stres oksydacyjny 33
3. METODY I URZĄDZENIA POMIAROWE 41
3.1. Pomiary luminescencji chlorofilu 41
3.1.1. Rejestracja indukcji fluorescencji chlorofilu 41
3.1.2. Pomiar wygaszania fluorescencji chlorofilu przy użyciu fluorymetru PAM 200 43
3.1.3. Wyznaczanie termogramów fluorescencji chlorofilu 46
3.1.4. Fotograficzna rejestracja zmian wydajności fluorescencji chlorofilu 48
3.1.5. Pomiar zaniku opóźnionej luminescencji chlorofilu 49
3.2. Pomiar ultrasłabej biochemiluminescencji 51
3.3. Pomiary konduktometryczne 53
3.4. Pomiary wymiany gazowej przy użyciu gazoanalizatora LCA-4 54
3.5. Pomiar zawartości chlorofilu przy użyciu miernika SPAD-502 55
3.6. Pomiary pomocnicze i opisy przyrządów pomiarowych 56
3.6.1. Pomiar gęstości strumienia fotonów przy użyciu fitofotometru FF-01 56
3.6.2. Pomiar stężenia CO_2 przy pomocy miernika AirTECH-2500 57
3.6.3. Pomiar powierzchni liści przy użyciu analizatora DIAS 59
3.7. Termoluminostaty 59

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA 63
4.1. Oddziaływanie chłodu i światła 63
4.1.1. Wpływ chłodu oraz chłodu i światła, a następnie fazy restytucji na fluorescencję chlorofilu w liściach dwóch odmian pomidora różniących się chłodowrażliwością 63
4.1.2. Wpływ chłodu i światła na fluorescencję chlorofilu w liściach dwóch odmian ogórka o zróżnicowanej chłodowrażliwością 68
4.2. Oddziaływanie wysokiej temperatury 71
4.2.1. Wpływ wysokiej temperatury na przebieg indukcji fluorescencji chlorofilu w roślinach dwóch odmian pomidora różniących się termowrażliwością 71
4.2.2. Wpływ hartowania na podwyższenie termoodporności roślin dwóch zróżnicowanych odmian pomidora 74
4.2.3. Wpływ mutacji genetycznej w roślinach rzepaku na wzrost ich termowrażliwości oraz zmiany wydajności luminescencji chlorofilu 76
4.3. Deficyt wody 79
4.3.1. Wpływ odwodnienia na opóźnioną luminescencję chlorofilu w liściach pszenicy i jęczmienia 79
4.3.2. Wpływ suszy oraz restytucji powstałych uszkodzeń stresowych na fluorescencję chlorofilu w liściach rzepaku 82
4.3.3. Wpływ spermidyny na fluorescencję chlorofilu w liściach rzepaku poddanych działaniu suszy, a następnie restytucji 84
4.4. Niedobór azotu 88
4.4.1. Wpływ azotanu amonowego na fluorescencję i zawartość chlorofilu oraz wydajność fotosyntezy w liściach roślin kukurydzy 88
4.4.2. Porównanie nawożenia azotanem amonu i siarczanem amonu na indukcję fluorescencji chlorofilu, suchą masę oraz powierzchnię liści rzepaku 91
4.5. Herbicydy – inhibitory fotosyntezy 94
4.5.1. Ocena fitotoksyczności prometryny oraz linuronu przy pomocy testu luminescencyjnego 94

4.5.2. Ocena selektywnej odporności roślin buraka oraz wrażliwości roślin komosy na pyrazon i fenmedifan ... 97
4.5.3. Badanie fitotoksycznego oddziaływania atrazyny, azyprotryny i linuronu na rośliny rzepaku triazynoodpornego oraz rzepaku wrażliwego na herbicydy inhibitory fotosyntezy ... 100
4.5.4. Fotograficzna rejestracja zmian wydajności fluorescencji chlorofilu w liściach fasoli pod wpływem atrazyny ... 105
4.6. Fotoinhibicja i stres oksydacyjny ... 108
4.6.1. Reakcja roślin dwóch zróżnicowanych genotypów rzepaku na zwiększone napromieniowanie PAR ... 108
4.6.2. Wpływ zwiększonego napromieniowania PAR na fluorescencję chlorofilu w liściach ogórka uprawianego przy zmniejszonym lub podwyższonym stężeniu CO_2 ... 112
4.6.3. Reakcja roślin dwóch zróżnicowanych odmian tytoniu Bel-B i Bel-W3 na oddziaływanie zanieczyszczonego powietrza miejskiego ... 116
5. DYSKUSJA I PODSUMOWANIE ... 124
6. WNIOSKI OGÓLNE ... 143
7. PIŚMIENNICTWO ... 144
8. STRESZCZENIE ... 156
9. SUMMARY ... 157

SPIS SKRÓTÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY

ATP – adenozynotrifosforan
ADP – adenozynodifosforan
FL – fluorescencja
FNR^+ – reduktaza ferredoksyna-NADP
FTE – fotosyntetyczny transport elektronów
IFL – indukcja fluorescencji
L_D – parametr informujący o szybkości zaniku OL chlorofilu
LHC – kompleks zbierający światło (wspólny dla obu fotosystemów)
LHC I, LHC II – kompleksy zbierające światło („anteny energetyczne"), odpowiednio w PS I i PS II
LRFR 400 – wysokoprężna lampa rtęciowo-fluorescencyjna stosowana do doświetlania roślin
$NADP^+$ – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma utleniona)
NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma zredukowana)
OL – opóźniona luminescencja chlorofilu
P700 – chlorofil w centrum fotosystemu I
P680 – chlorofil w centrum fotosystemu II
PAR – promieniowanie fotosyntetycznie czynne (400÷700 nm)
PPFD – gęstość strumienia fotonów fotosyntetycznie czynnych
PS I – fotosystem I
PS II – fotosystem II
PQ – plastochinon
PQ_A – plastochinon związany z białkiem D2 w miejscu Q_A
PQ_B – plastochinon związany z białkiem D1 w miejscu Q_B
RFT – aktywne (reaktywne) formy tlenu
TL-1 – termoluminostaty zapewniające kontrolowane warunki wzrostu roślin
UBCL – ultrasłaba biochemiluminescencja

1. WSTĘP I CEL PRACY

Na rośliny rosnące w naturalnych warunkach oddziałuje wiele niekorzystnych czynników środowiska określanych jako **czynniki stresowe**, które mogą zakłócać procesy bioenergetyczne, zmieniać metabolizm roślin, powodować uszkodzenia ich struktur komórkowych i tym samym wpływać na obniżenie plonu rolniczego. Na Rys. 1 wyszczególniono kilka ważniejszych czynników stresowych, których oddziaływanie na rośliny uprawne jest przedmiotem rozprawy.

Czynniki stresowe o umiarkowanym nasileniu wywołują w roślinach reakcje przystosowawcze (zmiany składu cytoplazmy, ograniczenie transpiracji, wzmożenie fotooddychania), a także mogą indukować ekspresję genów kodujących **białka odpornościowe**, np. białka szoku cieplnego, stresu osmotycznego i in. [56,178].

Rys. 1. Badane czynniki stresowe oddziałujące na rośliny uprawne.
Fig. 1. Analysed stress factors affecting crop plants.

Jeżeli nasilenie oddziaływań czynników stresowych nie przekracza genetycznie uwarunkowanej odporności rośliny, to następuje jej **aklimatyzacja** do zmienionych niekorzystnie warunków, w przeciwnym razie roślina ginie. Zarówno zdolność do przezwyciężania stresów, jak i do przeprowadzania głębokich zmian funkcjonalno-strukturalnych podczas hartowania są cechami wysoko ocenianymi przez hodowców i praktyków. Niestety dość często podwyższonej produktywności nowych odmian roślin uprawnych towarzyszy obniżenie ich potencjału przystosowawczego.

Populacje roślin występujące w poszczególnych strefach klimatycznych lub zasiedlające specyficzne siedliska (np. gleby zasolone) w toku długotrwałej ewolucji przystosowały się do określonych warunków środowiskowych. Proces takiego przystosowania się roślin do miejscowych warunków klimatycznych i glebowych nosi nazwę **adaptacji** [78].

Na nieoptymalne warunki klimatyczne i gazowe zanieczyszczenia atmosfery najbardziej narażone są organy asymilacyjne roślin (liście i szpilki), a proces **fotosyntezy** jest szczególnie uwrażliwiony na większość czynników stresowych. Wszelkie zakłócenia, zarówno w przebiegu reakcji fazy świetlnej, jak również reakcji fazy ciemnej fotosyntezy znajdują swoje odbicie w zmianach wartości parametrów **fluorescencji chlorofilu i opóźnionej luminescencji chlorofilu** [61,101,159]. Dość często na rośliny działa jednocześnie kilka czynników stresowych, czyli tzw. **multistres**, którego wynikiem może być bardzo niebezpieczny stres oksydacyjny będący skutkiem oddziaływania aktywnych form tlenu na struktury komórkowe [66,154,196]. Inicjowane są wówczas procesy wolnorodnikowego utleniania lipidów membranowych, a rekombinacji powstających nadtlenków towarzyszy emisja promieniowania nazwana **ultrasłabą biochemiluminescencją**. Detekcja tej luminescencji umożliwia ocenę stanu fizjologicznego roślin, pozwala określić sprawność systemu przeciwutleniającego oraz homeostazę komórki roślinnej w warunkach stresowych [169,192,193].

Wymienione metody luminescencyjne charakteryzuje wysoka czułość, pomiary wykonywane są szybko i w sposób nieinwazyjny, a cały proces pomiarowy jest łatwy do zautomatyzowania.

Celem pracy było zbadanie, z wykorzystaniem różnorodnych metod luminescencyjnych, wpływu niektórych czynników stresowych oddziałujących na przebieg reakcji fotosyntezy oraz skuteczność ochrony przeciwutleniającej w wybranych roślinach uprawnych.

W części doświadczalnej pracy zamieszczono kilkanaście szczegółowych opisów takich prac badawczych. Każdy opis stanowi autonomiczną całość, na którą składają się: **cel badań**, **materiał i metody**, **dyskusja wyników** oraz **wnioski.**

Szczegółowe cele przedstawionych badań można pogrupować następująco:

- reakcje roślin na klimatyczne czynniki stresowe (niska i wysoka temperatura, deficyt wody),
- wpływ nieoptymalnego nawożenia azotowego i azotowo-siarkowego na proces fotosyntezy oraz niektóre wskaźniki wzrostu i rozwoju roślin,
- ocena fitotoksycznego oddziaływania herbicydów inhibitujących fotosyntezę,

- oddziaływanie czynników stresowych wywołujących fotoinhibicję i stres oksydacyjny.

Badania wykonano wykorzystując zestawy do pomiarów luminescencyjnych zaprojektowane i skonstruowane w Pracowni Biofizyki Akademii Rolniczej w Szczecinie, a także inne urządzenia pomiarowe jak np.: gazoanalizator LCA-4, fluorymetr PAM 200 i miernik chlorofilu SPAD-502.

Bardziej ogólnym zamierzeniem prezentowanej pracy, tak jak i wcześniejszych publikacji autora jest wykazanie możliwości oraz zalet **metod luminescencyjnych** zastosowanych w badaniach ekofizjologicznych, pracach selekcyjnych (hodowla roślin, kultury *in vitro*, inżynieria genetyczna) oraz w monitoringu zagrożeń ekologicznych.

2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

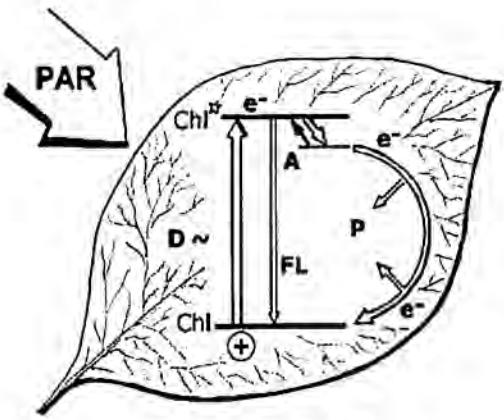
2.1. Biofizyczne aspekty procesu fotosyntezy i luminescencja chlorofilu

2.1.1. Etapy konwersji energii fotonów PAR w procesie fotosyntezy

Fotosynteza jest najważniejszym procesem bioenergetycznym na Ziemi, dzięki któremu powstała i funkcjonuje **biosfera** w swojej obecnej postaci. Fotosynteza jest procesem kilkuetapowym, w wyniku którego następuje przemiana energii zaabsorbowanych **fotonów** w stabilną energię chemiczną (Rys. 2). W roślinach zielonych oraz glonach proces fotosyntezy jest zlokalizowany w organellach komórkowych – **chloroplastach**. Ich wnętrze wypełnia płynna **stroma** zawierająca enzymy konieczne do przeprowadzenia reakcji **fazy ciemnej fotosyntezy** oraz zgrupowane i połączone ze sobą pęcherzyki **tylakoidów**, w których zachodzą reakcje **fazy świetlnej fotosyntezy**. Wymienione reakcje przebiegają w kilku makrokompleksach (Rys. 3) wbudowanych w błonę tylakoidu: fotosystemu II (**PS II**), cytochromu b_6f (**cyt b_6f**), fotosystemu I (**PS I**) i ściśle z nimi związanym, wspólnym dla obu fotosystemów kompleksie zbierającym światło (**LHC**). Specjalną rolę pełni kompleks **syntazy ATP**, który sprzęga wypływ protonów z wnętrza tylakoidu do stromy z jednoczesną syntezą ATP [57].

Absorpcja fotonów z zakresu PAR (400 nm ÷ 700 nm) przez cząsteczki chlorofilu lub innych barwników fotosyntetycznych zachodzi w kilku, białkowo-barwnikowych **kompleksach zbierających energię świetlną**, czyli w tzw. antenach energetycznych zlokalizowanych w błonach tylakoidów (LHC, LHC II, LHC I) [182]. Fotosynteza ma swój początek w momencie absorpcji fotonu z zakresu PAR, co wiąże się ze wzbudzeniem elektronu walencyjnego w cząsteczce chlorofilu (**Chl→ Chl***). Energia

tego wzbudzenia może zostać wypromieniowana w postaci fluorescencji – **FL,** ulec rozproszeniu poprzez oddziaływania termiczne – **D,** lub w toku dalszych przemian zainicjować reakcje fazy świetlnej fotosyntezy – **P** (Rys. 2). Warunkiem zaistnienia reakcji **P** jest przeniesienie elektronu z poziomu **Chl*** na poziom **A** (pierwotnego akceptora w danym fotosystemie).



E(PAR)=P+FL+D

Rys. 2. Absorpcja promieniowa-nia PAR przez chlorofil i możliwe sposoby wykorzystania energii wzbudzenia. Objaśnienia w tekście.

Fig. 2. PAR absorption by chlorophyll and possible ways of excitation energy use. Description in text.

Fotofizyczny etap fotosyntezy

Energia fotonu pochłoniętego przez cząsteczkę chlorofilu przekształca się w energię **ekscytonu**, który ma zdolność przemieszczania się (migracji) w obrębie anteny zawierającej 200 ÷ 300 cząsteczek: chlorofilu *a*, chlorofilu *b* oraz pewnej ilości cząsteczek karotenów i ksantofili. Krótki czas życia ekscytonu (ok. kilku ns) stwarza możliwość jego zaniku na drodze dezaktywacji promienistej, czyli wypromieniowaniu fotonu FL (λ_{max}= 685 nm) bądź też w na drodze oddziaływań termicznych z sąsiednimi cząsteczkami w antenie energetycznej [40].

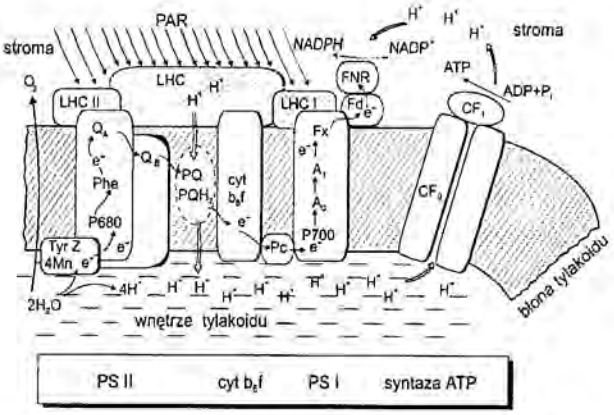
Z antenami związane są **centra reakcji**, które są utworzone przez specyficzne pary cząsteczek (dimery) chlorofilu *a*. W centrum reakcji fotosystemu II znajduje się chlorofil, który ze względu na maksimum absorpcji 680 nm określa się jako

P680. Chlorofil w centrum związanym z PS I (tzw. długofalowym) określa jest jako **P700**, ponieważ wykazuje maksimum absorpcji przy 700 nm.

Jeżeli ekscyton migrujący w kompleksie antenowym PS II w czasie swojego życia zdąży osiągnąć centrum reakcji to spowoduje wzbudzenie P680 (Rys. 3). Wzbudzony elektron w cząsteczce tego chlorofilu zostaje przekazany na przejściowy akceptor – feofitynę (**Phe**). Następuje pierwotny **rozdział ładunku**, czyli generacja pary rodnikowej: $P680^+$ Phe^- [40, 193]. Elektron z Phe^- zostanie w czasie ok. 0,4 ns przeniesiony na $\mathbf{PQ_A}$ (plastochinon zlokalizowany w miejscu Q_A na białku D2), będący **pierwszym stabilnym akceptorem** elektronów w PS II ($P680^+$ Phe^- $PQ_A \rightarrow$ $P680^+$ Phe PQ_A^-). Utleniona cząsteczka chlorofilu w centrum reakcji $P680^+$ zostanie (w czasie ok. 30 ns) zneutralizowana przez elektron odebrany od tyrozyny (**TyrZ**), aminokwasu zlokalizowanego w kompleksie rozkładu wody na donorowej stronie PS II (TyrZ $P680^+ \rightarrow TyrZ^+$ P680). W taki sposób uzyskana zostaje względnie trwała separacja ładunków rozdzielonych w centrum PS II. Lokalizacja ładunków na stabilnym akceptorze oraz stabilnym donorze zapobiega ich **rekombinacji,** co warunkuje efektywne wykorzystanie energii wzbudzenia elektronowego w dalszych etapach procesu fotosyntezy [182].

Fotochemiczny etap fotosyntezy

Rozdzielone w PS II ładunki elektryczne inicjują **ciąg reakcji oksydo-redukcyjnych** zarówno na akceptorowej, jak i donorowej stronie tego makro-kompleksu (Rys. 3). Na stronie akceptorowej PS II ujemny ładunek z PQ_A^- jest przekazywany na PQ_B (plastochinon zlokalizowany w miejscu Q_B na białku D1), co powoduje jego przejście w formę zredukowaną PQ_B^-. Po powtórnym zredukowaniu przez elektron przekazany od PQ_A^-, jon PQ_B^{2-} pobiera dwa protony ze środowiska stromy i już jako cząsteczka plastochinolu – PQH_2 odczepia się od D1, przechodząc do puli plastochinonowej [89, 135]. W tym samym momencie zwolnione miejsce Q_B zostaje obsadzone przez którąkolwiek cząsteczkę PQ z puli plastochinonów. Plastochinol przemieszcza się na drugą (donorową) stronę błony tylakoidu i tam zostaje utleniony do PQ, oddając kolejno dwa elektrony podczas, katalizowanej przez cyt b_6f redukcji centrum żelazo-siarkowego oraz plastocyjaniny (**Pc**). Uwolnione dwa protony zostają „wpompowane" do wnętrza tylakoidu (Rys. 3). Kompleks cyt b_6f wraz z pulą plastochinonów działają jak pompa protonowa przenosząca jony wodoru ze środowiska stromy do wnętrza tylakoidu, powodując wzrost jego zakwaszenia (przy dobrym oświetleniu może osiągnąć ono pH 4). W rezultacie działania tej pompy wytwarza się **gradient stężenia protonów** w poprzek błony tylakoidu będący siłą napędową procesu wytwarzania ATP [183].



Rys. 3. Usytuowanie makro-kompleksów uczestniczących w reakcjach fazy świetlnej fotosyntezy. Objaśnienia w tekście.

Fig. 3. Position of macro-complexes participating in light-phase photosynthesis reactions. Description in text.

Na wewnętrznej (donorowej) powierzchni błony tylakoidalnej znajduje się manganowo–białkowe centrum rozkładu wody, będące częścią PS II. W centrum tym główną rolę spełniają 4 atomy manganu umożliwiające czteroetapowe utleniania dwóch cząsteczek wody w rezultacie 4 kolejnych aktów wzbudzenia elektronowego P680. Po odprowadzeniu czterech elektronów od 2 H_2O (poprzez manganowy „akumulator" ładunków – **4 Mn** i tyrozynę **Tyr Z**) do fotoutlenianego centrum reakcji P680, następuje wydzielenie jednej cząsteczki O_2, a do wnętrza tylakoidu uwalniane są cztery protony (Rys. 3). Dzięki takiemu rozwiązaniu w reakcji, określanej jako fotosyntetyczna **fotoliza wody**, następuje jednoczesny rozkład dwóch cząsteczek H_2O umożliwiający odłączenie tlenu w postaci O_2, a więc w formie najmniej „szkodliwej" dla struktur komórkowych. Praktycznie cały tlen znajdujący się obecnie w biosferze jest produktem ubocznym procesu fotosyntezy. Dzięki zdolności do fotolizy wody organizmy fotosyntetyzujące mogą wykorzystywać wodę jako łatwo dostępne źródło jonów wodoru wykorzystywanych w procesie redukcji CO_2 [57].

Kompleks syntazy ATP nie bierze bezpośredniego udziału w fotosyntetycznym transporcie elektronów od wody do $NADP^+$, jednak funkcjonalnie jest ściśle związany z przetwarzaniem energii w procesie fotosyntezy. Syntaza składa się z tzw. „nóżki" (**CF_0**), która przenika błonę tylakoidu i katalitycznej „główki" (**CF_1**) przyłączonej do jednostki CF_0 od zewnętrznej strony tylakoidu (Rys. 3).

W rezultacie reakcji fotochemicznych (fotolizy wody i działania pompy protonowej) we wnętrzu tylakoidu następuje wzrost stężenia protonów wytwarzający **siłą protonomotoryczną**. Jeżeli gradient protonów w poprzek błony tylakoidu odpowiada 3,5 jednostkom pH, to różnica potencjału pomiędzy stromą (skąd były pobierane protony) a wnętrzem tylakoidu może przekroczyć 200 mV [183]. Kompleks syntazy ATP stanowi swoisty „wentyl" (CF_0 to rodzaj rurki utworzonej przez białka strukturalne), przez który wydostają się protony z wnętrza tylakoidu i rozpędzone przez siłę protonomotoryczną wnikają do CF_1, co warunkuje endoergiczną reakcję fosforylacji ADP.

Do syntezy 1 mola ATP z ADP i reszt fosforanowych P_i wymagana jest energia 3 moli H^+ przepływających przez kompleks syntazy ATP, co odpowiada związaniu energii swobodnej równej ok. 60 kJ. Zmagazynowana w wiązaniach ATP energia chemiczna uwalniana jest podczas reakcji hydrolizy i wykorzystywana w fazie ciemnej fotosyntezy, a także umożliwia ona szereg innych funkcji życiowych w komórkach roślin i zwierząt [183].

W fazie świetlnej fotosyntezy współdziałają ze sobą oba fotosystemy. Fotony z zakresu PAR zaabsorbowane przez energetyczne anteny barwnikowe związane z PS I wytwarzają ekscytony, które przemieszczają się w obszarach tych anten podobnie jak ekscytony w PS II. Gdy migrujący ekscyton osiągnie centrum PS I wzbudza znajdującą się tam cząsteczkę chlorofilu P700. Następuje wówczas rozdział ładunków, a wzbudzony elektron zostaje w czasie 15 ps przekazany na pierwotny akceptor (**A_0**) redukując go do A_0^-. Utleniony chlorofil $P700^+$ przejmuje elektron od zredukowanej PC^-, ostatniego akceptora w PS II. Wzbudzony elektron z A_0^- zostaje przekazany na chinon (**A_1**), a następnie na kolejne centra żelazo-siarkowe (**F_X**) i na koniec redukuje ferredoksynę (**Fd**), akceptor zlokalizowany na zewnętrznej stronie błony tylakoidu. Znajdujący się w jej sąsiedztwie enzym reduktaza ferredoksyna-$NADP^+$ (**FNR**) katalizuje przeniesienie elektronu z Fd na $NADP^+$. Po przejęciu kolejno dwóch elektronów z Fd następuje przyłączenie dwóch protonów do $NADP^+$ i powstaje silny reduktor NADPH. Pobieranie jonów H^+ z przestrzeni stromy zmniejsza jej dodatni ładunek, a tym samym zwiększa dodatkowo gradient stężenia protonów w poprzek błony tylakoidu. Opisany przepływ elektronów poprzez trzy makrokompleksy aparatu fotosyntetycznego nazwano **niecyklicznym transportem elektronów** [57,182].

Reakcję redukcji $NADP^+$ można zapisać sumarycznie:

$$\mathbf{2\ H_2O + 2\ NADP^+ + energia\ 8\ fotonów\ PAR \rightarrow 2\ NADPH + O_2}$$

Niezbędna jest absorpcja 8 fotonów w 2 fotoreakcjach (w PS II i PS I), aby $4e^-$ zostały przetransportowane od dwóch cząsteczek H_2O na dwie cząsteczki $NADP^+$ oraz nastąpiło wydzielenie jednej cząsteczki O_2. Jeżeli w procesie fotosyntezy wykorzystywane będzie promieniowanie czerwone (np. $\lambda = 680$ nm) to zaabsorbowanie 8 moli takich fotonów dostarczy 1412 kJ energii.

Podczas przepływu elektronów od wody do $NADP^+$ w trzech miejscach łańcucha transportu mają miejsce procesy zwiększające gradient stężenia protonów pomiędzy stromą i wnętrzem tylakoidu:

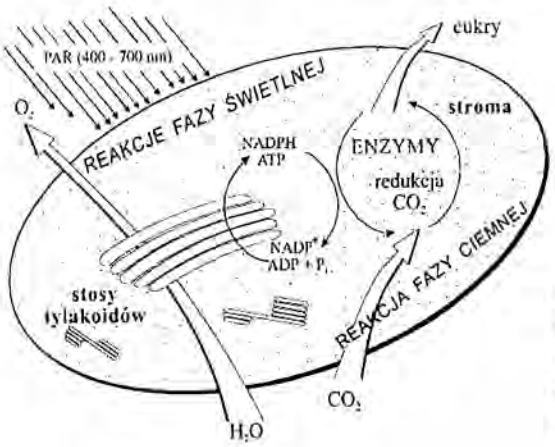
1. fotoliza H_2O w kompleksie rozkładu wody (wydzielenie cząsteczki tlenu i czterech protonów); $2\ H_2O$ + energia 4 fotonów (PAR) $\rightarrow 4\ H^+ + 4e^- + O_2$,
2. pompa protonowa w b_6f; przy transporcie $4e^-$ przeniesione zostają $4\ H^+$,
3. redukcja $NADP^+$ w PS I i przyłączenie $4\ H^+$ ze stromy powodujące jej alkalizację; $2\ NADP^+ + 4\ Fd^- + 4\ H^+$+ energia 4 fotonów (PAR)$\rightarrow 2\ NADPH + 2\ H + 4\ Fd$.

Wynika stąd, że przy przepływie 4 wysokoenergetycznych elektronów przez układ trzech makrokompleksów następuje przeniesienie $8\ H^+$ ze środowiska stromy do wnętrza tylakoidu, a ich wypływ przez kompleks syntazy jest źródłem prawie 3 ATP uwalnianych bezpośrednio do obszaru stromy. Przedstawiony sposób wytwarzania czynnika energetycznego podczas niecyklicznego transportu elektronów od H_2O do $NADP^+$ poprzez makrokompleksy: PS II, cyt b_6f oraz PS I określa się mianem **fotofosforylacji niecyklicznej**.

W warunkach nadmiaru światła (w celu przeciwdziałania fotoinhibicji) lub przy niedoborze ATP może być uruchamiany **cykliczny transport elektronów**, podczas którego nie następuje rozkład wody i nie jest wytwarzany czynnik redukcyjny NADPH. Podczas takiego procesu, w którym aktywny jest tylko PS I, wysokoenergetyczny elektron z Fd jest przekazywany do kompleksu cyt b_6f, co umożliwia przeniesienie protonu ze stromy do wnętrza tylakoidu (działanie pompy protonowej), a następnie elektron ten poprzez Pc wraca do utlenionego centrum $P700^+$. Wytworzona siła protonomotoryczna umożliwia syntezę ATP, a proces taki określa się mianem **fotofosforylacji cyklicznej**. W przebiegu reakcji fazy świetlnej fotosyntezy (etapu fotofizycznego i fotochemicznego) wytwarzane są dwa kluczowe dla fotosyntezy związki określane również jako **siła asymilacyjna**: NADPH (o bardzo wysokim potencjale redukcyjnym) i ATP (uniwersalny związek wysokoenergetyczny). Oba te związki uwalniane są bezpośrednio do stromy, gdzie biorą udział w redukcji CO_2 do poziomu węglowodanów w biochemicznym etapie fotosyntezy [182].

Etap biochemiczny fotosyntezy

W stromie chloroplastu, oprócz CO_2 i składników siły asymilacyjnej, znajdują się wszystkie enzymy niezbędne do katalizowania reakcji syntezy stabilnych produktów organicznych (Rys. 4). Ponieważ do tych reakcji niepotrzebne jest światło jako czynnik energetyczny (chociaż działa ono regulująco na aktywność wielu enzymów czynnych zarówno w reakcjach anabolicznych jak i katabolicznych), etap ten nazwano ciemną fazą fotosyntezy [183].



Rys. 4. Współdziałanie reakcji fazy świetlnej fotosyntezy z enzymatycznymi reakcjami fazy ciemnej w chloroplaście. Objaśnienia w tekście.

Fig. 4. Cooperation of light-phase photosynthesis reactions and dark-phase enzymatic reactions in chloroplast. Description in text.

Prawie wszystkie rośliny uprawiane w klimacie umiarkowanym (z wyjątkiem kukurydzy i niektórych innych roślin) należą do roślin **typu C_3**, w których CO_2 przyłączany jest do cząsteczki rybulozo-1,5-bisfosforanu (**RuBP**) i powstają dwie cząsteczki kwasu 3-fosfoglicerynowego, a reakcja ta jest katalizowana przez enzym karboksylazę/oksygenazę rybulozo-1,5-bisfosforanową (nazywany często **rubisco**). Rubisco nie tylko katalizuje przyłączanie dwutlenku węgla (karboksylację), ale także ma zdolność katalizowania reakcji przeciwnej tzn. utleniania RuBP. W temperaturze 25°C, 21% O_2 i 0,037% CO_2 aktywność karboksylazowa rubisco jest ok. trzykrotnie wyższa od jej aktywności oksygenazowej [183]. Reakcja utleniania RuBP nazwana **fotooddychaniem** występuje powszechnie u roślin typu C_3. Zjawisko to nasila się w warunkach podwyższonej temperatury i silnego światła, a także przy niskim stężeniu CO_2 w liściu np. podczas intensywnej fotosyntezy. Reakcja fotooddychanie praktycznie nie zachodzi w roślinach **typu C_4** (np. kukury-

dzy, trzcinie cukrowej, w niektórych chwastach). Do niedawna fotooddychanie uważane było za zjawisko szkodliwe zmniejszające produktywność fotosyntetyczną i obniżające produkcję biomasy. Są jednak przesłanki, iż w pewnych warunkach stresowych (np. niskie stężenie CO_2, zmniejszona wydajność reakcji fazy ciemnej) proces ten może chronić aparat fotosyntetyczny przed fotoinhibicją [66]. Kwas 3-fosfoglicerynowy, będący pierwszym trwałym produktem asymilacji CO_2 w ciemnej fazie fotosyntezy, ulega kolejno fosforylacji (z udziałem ATP), a następnie redukcji (z udziałem NADPH) do aldehydu 3-fosfoglicerynowego. W szeregu reakcjach regeneracyjnych katalizowanych przez specjalne enzymy następuje odtworzenie pierwotnego akceptora CO_2 – RuBP. Cały ten cykl kolejnych reakcji karboksylacji, redukcji i regeneracji nosi nazwę (od nazwisk odkrywców) **cyklu Calvina-Bensona**. W wyniku tych reakcji powstają cukry proste (np. glukoza), wielocukry, aminokwasy i wszystkie inne produkty roślinne. Do syntezy glukozy niezbędnych jest 12 cząsteczek ATP i 12 cząsteczek NADPH oraz dodatkowo 6 cząsteczek ATP do regeneracji RuBP.

Do syntezy mola glukozy wymagany jest minimalny wkład energii ok. 2800 kJ. Utlenienie 12 moli NADPH do $NADP^+$ dostarcza 2640 kJ, a hydroliza 18 moli ATP dostarcza 558 kJ, co w sumie daje 3198 kJ. Stąd wynika, że maksymalna sprawność reakcji w ciemnej fazie fotosyntezy podczas zamiany energii chemicznej zawartej w cząsteczkach ATP i NADPH na energię chemiczną glukozy wynosi prawie 88% [182].

Ponieważ do syntezy jednej cząsteczki ATP wymagany jest przepływ 3 protonów przez kompleks syntazy ATP należy przyjąć, że do „wyprodukowania" niezbędnych 18 cząsteczek ATP zostało zużytych 54 H^+. Taka ilość protonów musiała być wcześniej wprowadzona do wnętrza tylakoidu. Uwolnienie jednego elektronu z H_2O (podczas jej fotolizy) i przeniesienie go poprzez kompleks cytochromowy b_6f (uruchomienie pompy protonowej) do PS I jest równoważne z wprowadzeniem dwóch protonów do wnętrza tylakoidu. Wynika stąd, że do syntezy jednej cząsteczki glukozy konieczna jest absorpcja 27 fotonów PAR w PS II i taka sama liczba fotonów w PS I, co umożliwia transport 27 elektronów przez oba fotosystemy, od cząsteczek rozłożonej wody do $NADP^+$.

Absorpcja 54 moli fotonów PAR (np. $\lambda = 680$ nm) niezbędnych do syntezy 1 mola glukozy dostarcza 9531 kJ. Wynika stąd, że łączna sprawność reakcji fotochemicznych i biochemicznych w procesie fotosyntezy może osiągnąć maksymalnie 29%. W warunkach naturalnych sprawność wykorzystania światła jest znacznie mniejsza, bowiem PAR stanowi ok. połowy promieniowania słonecznego, jego część (15% ÷ 25%) zostaje przez rośliny odbita lub przepuszczona, a część pochłoniętej energii fotonów zamienia się na ciepło. Niewielka jej ilość

(0,5% ÷ 5%) zostanie wypromieniowana w postaci FL chlorofilu. Z dostępnych oszacowań można przyjąć, że rośliny uprawne naszej strefy klimatycznej w całym okresie swojej wegetacji wykorzystują od 1% do 3% energii słonecznej padającej na obszar przez nie zajmowany [30].

Reasumując powyższe rozważania, należy uznać, że fotosyntetyczna konwersja labilnej energii fotonów w stabilną energię chemiczną zawartą w różnorodnych produktach roślinnych jest procesem wieloetapowym i wyjątkowo złożonym.

Proces przemian energetycznych rozpoczyna się w momencie absorpcji fotonu (**A**) z zakresu PAR przez cząsteczkę barwnika fotosyntetycznego w antenie energetycznej. Powstaje ekscyton (**B**), który osiągając cząsteczkę chlorofilu w centrum reakcji fotosystemu powoduje jego wzbudzenie elektronowe (**C**), a rozdzielone ładunki są stabilizowane na pierwotnym akceptorze i donorze wytwarzając potencjał oksydoredukcyjny. Następuje transport elektronu (w efekcie ciągu reakcji oksydoredukcyjnych) od rozłożonej cząsteczki wody poprzez centrum PS II, łańcuch kolejnych akceptorów, pompę protonową w b_6f, centrum PS I (dopełniające fotowzbudzenie!), kolejne akceptory i ferredoksynę do $NADP^+$, który pobierając 2 elektrony przybiera postać zredukowaną NADPH (**D**). Część energii elektronów przekazywanych od PQ na makrokompleks b_6f zostaje wykorzystana do przeniesienia protonów z obszaru stromy do wnętrza tylakoidu, co zwiększa transbłonowy gradient protonowy [**E**]. Protony z wnętrza tylakoidu napędzane siłą protonomotoryczną przepływają z powrotem do środowiska stromy poprzez kompleksy syntazy ATP przekształcając w nich energię elektrochemiczną na energię wiązań wysokoenergetycznych w cząsteczkach ATP (**F**). Wytworzone w reakcjach fazy świetlnej fotosyntezy produkty (**ATP** i **NADPH**) umożliwiają reakcje syntezy w fazie ciemnej. Efektem tego procesu jest wytworzenie wszelkich produktów energetycznych, strukturalnych i zapasowych w roślinach (**G**).

W skład łańcucha przemian energetycznych podczas fotosyntezy wchodzą:

(**A**) energia promieniowania elektromagnetycznego,
(**B**) energia ekscytonu,
(**C**) energia wzbudzenia elektronowego w centrach reakcji,
(**D**) energia chemiczna silnego reduktora NADPH,
(**E**) energia elektrochemicznego gradientu protonowego, czyli siła protonomotoryczna,
(**F**) energia chemiczna uniwersalnego nośnika energii metabolicznej ATP,
(**G**) energia chemiczna zawarta w stabilnych produktach zapasowych.

Czas trwania **etapu fotofizycznego fotosyntezy** (absorpcja fotonu – wzbudzenie centrum reakcji i separacja ładunków) jest rzędu 10^{-9} s.

Czas trwania **etapu fotochemicznego fotosyntezy** (transport elektronu przez makrokompleksy i reakcje syntezy siły asymilacyjnej) jest rzędu 10^{-2} s.

Czas trwania **etapu biochemicznego fotosyntezy** (redukcja CO_2 do poziomu cukrów) jest rzędu 10 s, natomiast całkowity czas uruchomienia reakcji cyklu Calvina-Bensona po ciemniowej adaptacji rośliny jest rzędu 10^2 s.

2.1.2. Fluorescencja chlorofilu oraz opóźniona luminescencja chlorofilu

Do monitorowania **stanów stresowych** w roślinach wywołanych przez niekorzystne czynniki środowiska bardzo dobrze nadają się liście, które w toku ewolucji zostały przystosowane do wychwytywania fotonów oraz do efektywnej wymiany gazowej (duża powierzchnia asymilacyjna i małą grubość blaszki). Z tego też względu właśnie liście są szczególnie narażone na niekorzystne czynniki klimatyczne np.: nadmierne napromieniowanie (prowadzące do fotoinhibicji), szybkie nagrzewanie i ochładzanie, łatwy dostęp toksyn gazowych, wrażliwość na suszę powietrzną i in.

Proces fotosyntezy, który w głównej mierze zachodzi w liściach jest szczególnie narażony na niekorzystne wpływy środowiska. Składa się on z trzech etapów o bardzo zróżnicowanych mechanizmach konwersji energii (fotofizycznym, fotochemicznym i biochemicznym) o czym świadczą m.in. czasy ich trwania (od 10^{-14} s do 10^2 s). Już tylko z tych przytoczonych okoliczności wynika, że synchronizacja wielu powiązanych ze sobą reakcji i optymalizacja ich wydajności są w warunkach stresowych znacznie utrudnione i łatwo mogą być zakłócone, zwłaszcza podczas uruchamiania procesu fotosyntezy po okresie ciemności (gdy był on „wyłączony") [40,101,183].

Fotosyntetycznym reakcjom konwersji energii wzbudzenia elektronowego towarzyszą straty cieplne oraz dezaktywacja promienista wzbudzonych cząsteczek chlorofilu, głównie w postaci FL. Ilość traconej energii podczas fotosyntezy w postaci FL nie jest duża (od 0,5% do ok. 5%), ale posiada ważne znaczenie informacyjne. Przy sprawnym przebiegu całego ciągu reakcji przemian energetycznych natężenie FL jest małe, natomiast wszelkie powstałe zakłócenia wywołują wzrost wydajności FL chlorofilu [13,100].

Z powyższych rozważań wynika celowość pomiaru oraz analizy zmian wydajności FL podczas uruchamiania i synchronizacji kolejnych etapów procesu fotosyntezy. Uzyskanie pełnej gotowości funkcjonalnej aparatu fotosyntetycznego (wcześniej zaadaptowanego do ciemności) wymaga kilku minut napromieniowania, w czasie których następują charakterystyczne zmiany w wydajności procesu przekształcania energii, którym towarzyszą równie charakterystyczne zmiany w natężeniu FL.

Zjawisko to nosi nazwę **indukcji fluorescencji chlorofilu** (**IFL**) lub, od nazwiska odkrywcy – efektu Kautskiego. W celu jego zarejestrowania należy wcześniej „wyzerować energetycznie" badany fragment tkanki asymilacyjnej np. blaszki liściowej. Wystarcza zwykle ok. 20 min. (chociaż stosuje się niekiedy nawet 40 min.) całkowitej ciemności, aby uzyskać stan równowagi energetycznej w tylakoidach i znaczne zmniejszenie zapasów enzymów cyklu Calvina-Bensona w stromie chloroplastów [57,97].

Indukcja fluorescencji chlorofilu – efekt Kautskiego

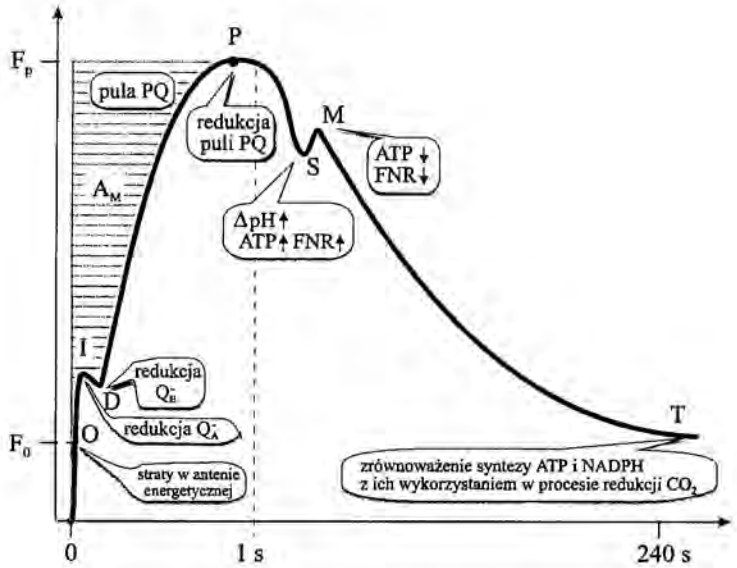
Przebieg IFL można podzielić na **fazę szybką**, która obejmuje czas inicjowania początkowych reakcji fazy świetlnej oraz **fazę wolną**, w której dominują procesy związane z uruchamianiem ciągu reakcji enzymatycznych niezbędnych do syntezy ATP, NADPH oraz redukcji CO_2 w stromie chloroplastów [159].

Ciemniowo zaadaptowany fragment liścia (lub innego organu asymilacyjnego) umieszcza się w komorze fluorymetru i włącza źródło PAR tzw. **światło aktyniczne** (**AL**). Natężenie tego promieniowania wzbudzającego FL chlorofilu można dobierać w szerokim zakresie (zwykle od 100 do 300 μmol (fotonów)$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). W momencie włączenia AL rozpoczyna się faza szybka IFL. Wartość pierwszego punktu pomiarowego wzbudzonej FL powinna być zarejestrowana nie później niż 40 μs od momentu włączenia AL. Wartość zmierzonej wtedy tzw. **zerowej FL chlorofilu** (**F_0**) odpowiada stratom radiacyjnym podczas migracji wzbudzenia w antenach energetycznych badanej próbki (Rys. 5).

Dalszy ciąg krzywej IFL obrazuje etapy obsadzania kolejnych akceptorów w PS II przez wzbudzone elektrony z P680. Pierwszym stabilnym akceptorem wzbudzonego elektronu w PS II jest PQ_A (plastochinon w miejscu Q_A), który odbiera elektrony od Phe^-. Już w ciągu pierwszych kilku milisekund trwania indukcji większość akceptorów PQ_A zostaje zredukowanych, transport elektronów zahamowany i w konsekwencji wzrost FL od **O** do **I** (Rys. 5). Po kilkunastu milisekundach uruchomiony zostaje sprawny transport elektronów od PQ_A^- na wtórny akceptor plastochinonowy PQ_B (w miejscu Q_B na białku D1) co powoduje przejściowe „odblokowanie" pierwotnych akceptorów na Q_A i krótkotrwałe (na ok. 20 ms) zmniejszenie FL – odcinek **I-D**.

W miarę postępującej redukcji kolejnych akceptorów następuje wzrost wydajności FL od punktu **D** do wartości w punkcie **P** (maksymalnej dla danej próbki). Osiągnięcie punktu **P** jest równoznaczne z osiągnięciem stanu maksymalnego zredukowania akceptorów (w głównej mierze plastochinonów z puli plastochinonowej) w PS II i w tym momencie wydajność reakcji fotosyntezy jest najmniejsza.

Pole powierzchni nad krzywą indukcji A_M informuje o wielkości puli zredukowanych akceptorów w PS II [13,87]. Jest to jednak tylko wówczas spełnione, gdy zostaną zachowane określone warunki eksperymentu i ustalona procedura pomiarowa, na co zwrócono uwagę w teoretycznej pracy o ograniczeniach związanych z interpretacją przebiegu krzywej IFL [189].



Rys. 5. Przebieg indukcji fluorescencji chlorofilu (efekt Kautsky'ego). Objaśnienia w tekście.
Fig. 5. Course of chlorophyll fluorescence induction (Kautsky's effect). Description in text.

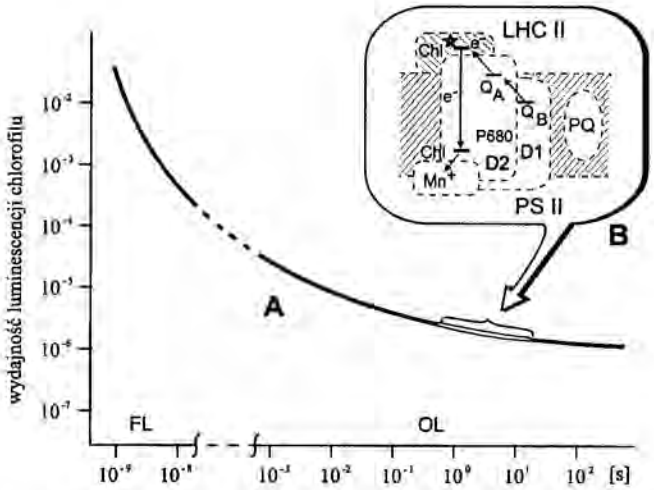
Maksymalna wartość IFL (punkt **P**) w normalnych warunkach zostaje osiągnięta po czasie ok. 0,5 ÷ 1,0 s od chwili rozpoczęcia indukcji. Po tym czasie gradient protonowy na błonie tylakoidu osiąga wartość, która umożliwia syntezę ATP w kompleksie syntazy ATP, a dostępny zapas FNR pozwala na redukcję $NADP^+$ do NADPH. Wytworzona siła asymilacyjna umożliwia start procesów ciemniowych prowadzących do redukcji CO_2. Następuje odpływ wzbudzonych elektronów z PS I, wzrasta szybkość ich transportu w całym łańcuchu akceptorów, a więc zmniejsza się prawdopodobieństwo dezaktywacji promienistej w postaci emisji FL. Informuje o tym opadający odcinek krzywej indukcji **P-S**. Gdy niewielki zapas FNR zostanie wyczerpany (po ok. 5 s÷9 s) zmaleje także szybkość redukcji $NADP^+$ i zahamowany zostanie odpływ elektronów z fotosystemów, co powoduje kolejny wzrost wydajności FL (na odcinku **S-M**).

Wzrost ten jest najczęściej krótkotrwały bowiem po upływie 2 s ÷ 5 s ilość wytwarzanego FNR jest już na tyle duża, że odpływ elektronów redukujących $NADP^+$ zaczyna przewyższać szybkość ich generacji w PS II. Jeżeli synteza ATP będzie równie wydajna to zużycie wytworzonej siły asymilacyjnej w reakcjach redukcji CO_2 zacznie wzrastać i efektywność wszystkich reakcji fotosyntezy ulegnie zróżnicowaniu, co uwidoczni się przez stopniowe obniżanie wydajności FL [13,57]. Osiągnięcie stanu stacjonarnego, czyli poziomu **T** (następujące zwykle po 150 s, a niejednokrotnie dopiero po 200 s) świadczy o zrównoważeniu wydajności reakcji fazy świetlnej fotosyntezy i spożytkowaniem wytworzonej siły asymilacyjnej w enzymatycznych reakcjach redukcji CO_2 do poziomu cukrów. Czas potrzebny do osiągnięcia poziomu stacjonarnego FL chlorofilu (**wygaszanie** FL) jest uzależniony od fazy rozwoju oraz stanu fizjologicznego badanej rośliny.

Stopień dopasowania szybkości reakcji w tylakoidach do szybkości reakcji enzymatycznych zachodzących w stromie chloroplastów określa parametr nazwany **wskaźnikiem witalności – Rfd** [100]. Ponieważ Rfd jest integralnym parametrem określającym pośrednio efektywność zarówno reakcji fazy świetlnej jak i fazy ciemnej, jest on uważany za wskaźnik potencjalnej zdolności chloroplastów do fotosyntetycznej konwersji energii. Wykorzystując pomiary IFL chlorofilu można określać stan funkcjonalnego rozwoju młodych liści oraz kształtowanie się ich aktywności fotosyntetycznej [29]. Definicję Rfd oraz innych ważnych parametrów IFL związanych z reakcjami fazy świetlnej fotosyntezy zamieszczono w części 3.1.1.

Obecnie dużą popularność zdobywają fluorymetry z modulowanym impulsowo promieniowaniem wzbudzającym FL chlorofilu i wykorzystujące impulsy światła nasycającego, tzw. system **PAM** [160]. Fluorymetry PAM pozwalają na szybką i wnikliwą ocenę wydajności przetwarzania energii zaabsorbowanych fotonów PAR na energię chemiczną [50,159,190]. Wykorzystując pomiary wygaszania fluorescencji chlorofilu, można prognozować potencjalną wydajność fotosyntetycznej asymilacji CO_2 [80,161]. Analiza parametrów fluorescencji została wykorzystana do badania stanów stresowych w roślinach uprawnych i wpływu zmienionych warunków (np. suszy, różnych stężeń CO_2) na fotosyntezę netto oraz fotooddychanie [26,102]. Opis działania fluorymetru typu PAM 200 oraz definicje stosowanych parametrów zamieszczono w części 3.1.2.

Następnym szczególnym momentem w procesie fotosyntezy jest przerwanie dopływu AL do badanej próbki liścia. Mimo braku reakcji w fazie świetlnej, z tkanek asymilacyjnych jest emitowane stopniowo zanikające promieniowanie, które można wykrywać przy pomocy czułych fotodetektorów jeszcze przez kilka minut od chwili wyłączenia AL (Rys. 6 A).



Rys. 6. Zanik luminescencji chlorofilu z tkanek asymilacyjnych po wyłączeniu promieniowania aktynicznego AL. Objaśnienia w tekście.

Fig. 6. Chlorophyll luminescence decay in assimilation tissues after exclusion actinic AL. Description in text.

Początek krzywej zaniku tego promieniowania jest zdominowany przez zanikającą FL z „anten" (czas półzaniku ok. 3 ns). Po „wyświeceniu" FL można rejestrować znacznie słabsze promieniowanie nazwane **opóźnioną luminescencją chlorofilu (OL)**, która prawie w całości jest emitowana z PS II. Widmo emisji OL jest bardzo podobne do widma FL chlorofilu (λ_{max} = 685 nm) [69,77,193].

Właściwości OL takie jak np. zmiana wydajności kwantowej, widma lub kinetyki zaniku, są badane przy użyciu fosforoskopów (w zakresie opóźnienia od kilku do kilkunastu milisekund) lub przy użyciu wyspecjalizowanych, wysokoczułych luminometrów (w zakresie od 10^{-1} s do 10^{2} s) [184,169].

Szczególnie interesujący jest zakres OL od 0,5 sekundy do ok. 20 sekund (czas liczony od momentu wyłączenia światła). W połowie lat 80 pojawiło się kilka prac doświadczalnych i teoretycznych, z których wynikało, że **składowa sekundowa OL** (od 0,5 s do ok. 2 s) jest wynikiem rekombinacji promienistej elektronu zlokalizowanego na PQ_A^- z dodatnim ładunkiem jonu manganu w kompleksie rozkładu wody. Warunkiem takiej rekombinacji jest przejście elektronu z poziomu Q_A na najniższy poziom wzbudzenia chlorofilu – Chl*, co może nastąpić gdy elektron uzyska utraconą część energii np. na drodze zderzeń termicznych (Rys. 6 B).

Źródłem emisji OL w zakresie dekasekundowym jest rekombinacja elektronu zlokalizowanego na PQ_B^-, będącym wtórnym stabilnym akceptorem PS II związanym z białkiem D1 w miejscu Q_B, z dodatnim ładunkiem jonu manganu w kompleksie rozkładu wody. Powrotne przejście elektronu z poziomu energetycznego Q_B na najniższy poziom wzbudzenia chlorofilu Chl* jest mniej prawdopodobne niż przejście w poprzednim przypadku bowiem poziom Q_B jest niższy od poziomu Q_A (Rys. 6 B). Z tego też względu natężenie emisji składowej dekasekundowej jest mniejsze niż składowej sekundowej, natomiast czas półzaniku $T_{1/2}$ dłuższy i zwykle przekraczający kilkanaście sekund [68,150].

Z porównania OL w zakresie sekundowym i dekasekundowym można uzyskać informacje o najbardziej wrażliwym ogniwie łańcucha transportu elektronów w PS II (przejście z PQ_A na PQ_B przez tzw. bramkę dwuelektronową), a tym samym o prędkości fotosyntetycznego transportu elektronów od czego zależy w dużym stopniu efektywność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy [68,193].

Badając oddziaływanie herbicydów – inhibitorów transportu elektronów na luminescencję chlorofilu, stwierdzono charakterystyczne zmiany kinetyki zaniku OL [67,112,118,120]. W szeregu pracach wykazano również, że analiza krzywej zaniku OL chlorofilu może dostarczać nie tylko cennych informacji o transporcie elektronów w makrokompleksach, ale także o anomaliach strukturalnych aparatu fotosyntetycznego oraz o wpływie czynników stresowych na rośliny i ich reakcjach przystosowawczych [19,21,123,125,165,193].

2.2. Oddziaływanie czynników stresowych na rośliny uprawne

2.2.1. Czynniki klimatyczne

Szereg roślin uprawnych, zwłaszcza pochodzących z obszarów subtropikalnych (ogórek, pomidor, fasola i. in.) wykazuje **chłodowrażliwość**. Rośliny te są zupełnie nieodporne na mróz, a temperatura od 0°C do 9°C (chłód) powoduje zaburzenia w przebiegu ich podstawowych funkcji życiowych. W wyniku tych zaburzeń zostaje zahamowany lub spowolniony wzrost roślin, następuje ich więdnięcie, a na liściach mogą pojawić się nekrozy. Dłużej trwające okresy chłodu wywołują znaczne i często nieodwracalne uszkodzenia, które mogą doprowadzić do śmierci rośliny. Główną przyczyną negatywnych skutków spowodowanych niską temperaturą są zakłócenia w selektywnej przepuszczalności błon cytoplazmatycznych, zmniejszenie aktywności enzymów, obniżenie efektywności fotosyntezy oraz modyfikacja ultrastruktury chloroplastów [75,177]. Niska temperatura wzmaga syntezę kwasu abscysynowego (**ABA**), pełniącego rolę

uniwersalnego hormonu alarmowego sterującego przeorganizowaniem funkcji komórki w warunkach działania czynników stresowych [178]. Rośliny odmian bardziej odpornych wytwarzają więcej ABA w porównaniu z roślinami tego samego gatunku, bardziej wrażliwymi na chłód [74,180]. Nawet łagodny chłód (6°C ÷ 8°C) przy umiarkowanym napromieniowaniu PAR [poniżej 100 μmol(fotonów)·m^{-2}·s^{-1}] może spowodować tak duże zaburzenia we wczesnym rozwoju roślin pomidora, że późniejsza akumulacja biomasy ulegnie istotnemu zmniejszeniu [17]. Chłód jest z reguły mniej szkodliwy, gdy występuje w ciemności lub przy niskim natężeniu światła, jednakże długotrwałe okresy obniżonej temperatury mogą i wówczas spowodować zakłócenia w funkcjonowaniu kompleksu rozkładu wody na donorowej stronie PS II [164], a także przyczynić się do inaktywacji kluczowego enzymu cyklu Calvina – **rubisco** [17,191]. Badania przeprowadzone na chloroplastach wykazały, że główną przyczyną uszkodzeń chłodowych w ciemności jest inaktywacja enzymów cyklu Calvina, natomiast chłód przy słonecznej pogodzie wywołuje dodatkowo zmiany degradacyjne w strukturze tylakoidów i zakłócenia reakcji fazy świetlnej fotosyntezy [75,170]. Jednoczesne oddziaływanie chłodu i silnego światła (np. słonecznego) jest dużo bardziej szkodliwe dla liści roślin chłodowrażliwych ponieważ w efekcie takiego oddziaływania często następuje niskotemperaturowa fotoinhibicja procesu fotosyntezy. W takich przypadkach obniżenie temperatury do wartości kilku stopni powyżej zera powoduje w stromie chloroplastów roślin chłodowrażliwych nieomal całkowite zahamowanie reakcji enzymatycznych (np. inaktywacja rubisco), co sprzyja generacji RFT i postępującej dezintegracji struktury aparatu fotosyntetycznego [18,84].

Badania mechanizmu chłodowrażliwości roślin pomidora doprowadziły do wniosku, że w warunkach długotrwałego chłodu nawet umiarkowane napromieniowanie może wywołać niskotemperaturową fotoinhibicję procesu fotosyntezy. W efekcie tego maleje sprawność reakcji fotochemicznej w PS II, spowolnieniu ulega transport elektronów i zmniejsza się wydajność fotofosforylacji [7,138]. Późniejsze prace wykazały, że pierwotną przyczyną efektów fotoinhibicyjnych jest prawdopodobnie zmniejszona zdolność zespołów barwników w antenach energetycznych do termicznego rozpraszania nadmiaru energii wzbudzenia oraz niekontrolowany wzrost RFT w chloroplastach. Takie mechanizmy dobrze tłumaczą uszkodzenia ultrastruktury błon tylakoidów oraz wzmożone tempo utleniania rubisco pod wpływem niskiej temperatury [84,136]. Skutki stresu chłodowego, a szczególnie oddziaływania niskotemperaturowej fotoinhibicji na strukturę

i funkcje aparatu fotosyntetycznego, można badać przy pomocy metod fluorescencyjnych oraz OL chlorofilu [57, 61,76,100,129,130,155,165].

W Zakładzie Fizyki AR w Szczecinie opracowano i opatentowano metodę oceny chłodoodporności, w której wykorzystano pomiar zaniku OL chlorofilu [116]. Metoda była testowana na roślinach ogórka należących do odmian szklarniowych i gruntowych [165].

Od kilkunastu lat są obserwowane w naszej strefie klimatycznej długotrwałe anomalie pogodowe, które najprawdopodobniej są związane z narastającym **efektem szklarniowym**. W miesiącach intensywnej wegetacji roślin (od kwietnia do końca czerwca) maksymalna dobowa temperatura powietrza w północno-zachodniej Polsce wielokrotnie przekracza 30°C [83]. Dłuższe okresy słonecznej pogody mogą spowodować wzrost temperatury liści do wartości przewyższających temperaturę otaczającego powietrza o 15°C. Dla wielu gatunków roślin wywołuje to stan stresu wysokotemperaturowego, nazywanego również **przegrzaniem**. Przegrzaniem określa się przekroczenie o 10°C optymalnej temperatury dla roślin naszej strefy klimatycznej, która wynosi najczęściej od 25°C do 30°C [178].

Podwyższenie temperatury może negatywnie wpływać na przebieg reakcji fazy świetlnej fotosyntezy oraz procesy wymiany gazowej w tkankach roślinnych [20,34,143,158]. Tkanki miękiszu asymilacyjnego, z racji ich funkcji i lokalizacji, są narażone na szereg jeszcze innych czynników stresogennych np. dehydratację, silne nasłonecznienie, UV, smog fotochemiczny. W wyniku oddziaływania podwyższonej temperatury może nastąpić uszkodzenie ultrastruktury chloroplastów, a nawet obserwowana jest nieodwracalna dezintegracja struktur lamellarnych charakterystyczna dla przyspieszonego procesu starzenia [186]. Pod wpływem podwyższonej temperatury (10°C ÷ 15°C powyżej zakresu optymalnego), w komórkach roślin ograniczona zostaje normalna synteza białek i rozpoczyna się intensywna synteza **białek szoku termicznego** [56]. Po trwającej zwykle kilka godzin, przebudowie struktury błon biologicznych może nastąpić podwyższenie ich termostabilności [81,144,194].

Badania przeprowadzone przy użyciu techniki fotoakustycznej [62], a także z wykorzystaniem termogramów OL [20] wykazały, że z dwóch fotosystemów bardziej labilny jest PS II. Prawidłowy przebieg fotosyntezy uwarunkowany jest zrównoważeniem szybkości reakcji fotochemicznych, w których energia fotonów zostaje wykorzystana do syntezy związków wysokoenergetycznych (ATP i NADPH), z reakcjami ciemniowymi, w których związki te zostają wykorzystane

do asymilacji CO_2. Wzrost temperatury wpływa na zmianę własności redukcyjno-utleniających akceptorów w PS II oraz zmniejsza sprawność FTE w obu fotosystemach [72]. Wymienione efekty prowadzą do zwiększenia strat energii wzbudzenia w zespołach barwnikowych na rzecz wzmożonej emisji FL stacjonarnej oraz zmianę przebiegu IFL chlorofilu [12,34,62,100,145,193].

Z doniesień literaturowych [42,98] wynika, że zwiększoną wrażliwość na podwyższoną temperaturę wykazują rośliny, w których uległ mutacji gen chloroplastowy *psb* A kodujący białko D1 (32 kD), z którym związany jest plastochinonowy akceptor elektronów PQ_B w PS II [162]. Opisaną mutację wykryto w niektórych genotypach chwastów (np. *Amaranthus retroflexus, Amaranthus hybridus, Senecio vulgaris, Erigeron canadensis*) i wykorzystano w hodowli triazynoodpornego rzepaku np. odm. Triton lub krajowych rodów 5972/2/89, 7841/1i/95 [114,115,120,134,198]. Wymieniona mutacja genetyczna podwyższa wprawdzie odporność na herbicydy triazynowe, jednak zwiększa wrażliwość takich roślin na podwyższoną temperaturę i fotoinhibicję powodując obniżenie ich produktywności [95,118,121,126,173].

Podwyższona temperatura może również zmniejszyć aktywność reakcji karboksylacji, katalizowanej przez enzym rubisco i wzmożenie utleniania wcześniej zredukowanych produktów czyli wzrost **fotooddychania**. Odzyskana w taki sposób pewna ilość, wcześniej zasymilowanego CO_2 może być ponownie zredukowana w reakcjach fazy ciemnej fotosyntezy. Proces fotooddychania zmniejsza nadmiar czynnika redukującego NADPH, który nie wykorzystany w reakcjach cyklu Calvina może spowodować generowanie silnie fitotoksycznych RFT [16,57]. W warunkach ograniczonego dopływu CO_2 lub inhibicji reakcji cyklu Calvina, fotooddychanie może, w pewnym zakresie chronić rośliny przed skutkami fotoinhibicji [66,182].

Uciążliwe zmiany klimatu, które nasiliły się w ostatnich dekadach mają głównie podłoże antropogeniczne i dlatego z dużym prawdopodobieństwem można prognozować zarówno ich wzrost, jak i kierunki oddziaływania na biosferę. Najbardziej niepokojącym przejawem tych zmian jest niestabilność w ilości oraz częstotliwości opadów atmosferycznych i narastający niedobór wody w glebie. Przewidywane jest szybkie stepowienie oraz okresowe susze na znacznych obszarach Europy, Azji i Ameryki Północnej. W Polsce średnioroczny opad wynosi zaledwie 600 mm i większość (ok. 58%) obszarów użytkowanych rolniczo cierpi na deficyt zasobów wodnych [133,171].

Niedobór wody należy do czynników stresowych, które mogą w decydującym stopniu ograniczyć wzrost i plonowanie roślin. Pierwszym objawem umiarkowanego deficytu wody jest zahamowanie wzrostu i tempa podziału komórek w liściach, co jest typową reakcją obronną bowiem roślina ograniczając przyrost swojej powierzchni asymilacyjnej ogranicza do pewnego stopnia utratę wody przez transpirację. Dłużej trwający deficyt wody może doprowadzić do poważnych zaburzeń w metabolizmie roślin, np. do zmniejszenia efektywności fotosyntezy. Inhibicji ulegają zarówno reakcje enzymatyczne w fazie ciemnej, jak również i reakcje fazy świetlnej [23,178]. Z danych literaturowych wynika, że niedobór wody silniej wpływa na efektywność procesu rozkładu wody (na donorowej stronie PS II) niż sprawność FTE [53,60].

Przedłużający się i narastający deficyt wody może spowodować nieodwracalne zmiany w strukturze błon biologicznych komórki. Uszkodzeniom ulegają białka, których agregaty ulegają denaturacji spowodowane zmianami w ich strukturze trzeciorzędowej, a także następuje utlenianie lipidów błonowych, co grozi utratą selektywnych właściwości błon biologicznych [78]. Większość roślin naszej strefy klimatycznej jest narażona podczas swojej wegetacji na okresowe niedobory wody. Strategia przetrwania takiego okresu może ograniczać się do zapobiegania odwodnieniu, a więc przymykania szparek w celu zmniejszenia transpiracji (co utrudnia jednak dopływ CO_2), ograniczenia powierzchni asymilacyjnej, a także do wzmożonego rozwoju systemu korzeniowego. Większe możliwości przetrwania suszy mają jednak te rośliny, które posiadają zdolność do zwiększenia swojej tolerancji na odwodnienie protoplastu bez naruszenia jego struktury i funkcji życiowych.

Mechanizmy reakcji komórek roślinnych na dehydratację nie zostały w pełni rozpoznane. Z pewnością kluczową rolę spełnia tu kwas abscysynowy (ABA), którego stężenie wzrasta w komórce od samego początku odwodnienia uruchamiając mechanizmy przeciwdziałające utracie wody przez roślinę [178]. Zwiększony poziom ABA powoduje selektywną ekspresję genów kodujących specjalne białka (dehydryny, osmotyny) spełniające funkcje ochronne w odwodnionych komórkach i łagodzące skutki przebytego stresu [56,79]. Podobnie jak ABA, inną niespecyficzną substancją o działaniu antystresowym jest aminokwas **prolina.** Dzięki jej właściwościom osmoregulacyjnym rośliny w warunkach suszy mogą bardziej efektywnie pobierać wodę z otoczenia i dłużej ją utrzymywać. Prolina wykazuje również oddziaływanie ochronne w fazie odwodnienia tkanki roślinnej stabilizując strukturę i funkcje błon biologicznych oraz poziom pH w cytoplazmie. Prolina umożliwia również lepszą akumulację nadmiaru czynnika

redukującego NADPH oraz przyspiesza naprawę uszkodzeń w fazie restytucji [8]. Ważną rolę w regulacji wielu funkcji fizjologicznych oraz metabolicznych spełniają w komórkach roślinnych **poliaminy** [49,132]. Szczególnie ważne funkcje ochronne spełniają poliaminy podczas oddziaływania na rośliny różnych czynników stresowych, np. podczas stresu wodnego w komórkach roślinnych stwierdzono wzmożoną akumulację poliamin [92,167]. Endogenne poliaminy (spermidyna, spermina, putrescyna) stabilizując strukturę i funkcje błon komórkowych wpływają na efektywną biosyntezę białek, ułatwiają proces restytucji i przyspieszają aklimatyzację roślin do zmieniających się warunków w środowisku [14,33]. Poliaminy spełniają także ważną rolę jako zmiatacze wolnych rodników, chroniąc w taki sposób lipidy membranowe przed peroksydacją [41]. W stężeniach wyższych niż to ma miejsce w warunkach naturalnych, poliaminy inhibitują reakcje fotosyntezy w chloroplastach [25,46]. Do oceny wpływu różnego typu czynników stresowych na reakcje fotosyntezy bardzo przydatne są metody wykorzystujące pomiary wygaszania FL chlorofilu przy użyciu fluorymetrów typu PAM oraz analiza krzywej IFL chlorofilu [100,119,155,159].

2.2.2. Niedobór azotu

Azot należy do grupy pierwiastków niezbędnych dla wzrostu i rozwoju roślin, a ilościowo może stanowić nawet 5% suchej masy tkanek roślinnych. Pierwiastek ten jest niezbędny do syntezy białek strukturalnych i enzymatycznych, nukleotydów, kwasów nukleinowych, chlorofilu, ATP, i szeregu innych związków koniecznych dla funkcjonowania roślin. Ze względu na kluczową rolę azotu w wytwarzaniu biomasy roślinnej słusznie jest on uważany za najważniejszy czynnik plonotwórczy [10,109]. Ogromnym rezerwuarem azotu jest atmosfera skąd może on być wiązany i przetwarzany biologicznie przy udziale mikroorganizmów. Intensywna produkcja rolnicza powoduje znaczne zubożenie gleby w ten pierwiastek, a powstały deficyt wymaga uzupełniającego nawożenia mineralnego. Najbardziej uniwersalną i często stosowaną grupą nawozów azotowych są nawozy saletrzano-amonowe. Zawierają one azot zarówno w formie azotanowej (saletrzanej) – NO_3^- jak i amonowej – NH_4^+. Przykładem takiego nawozu jest azotan amonowy – NH_4NO_3 zawierający łącznie 17,5% N w formie mobilnych w roztworze glebowym i łatwo przyswajalnych przez rośliny jonów azotanowych oraz taką samą ilość azotu w formie jonów amonowych silnie sorbowanych w glebie i stopniowo udostępnianych roślinom [109].

Niedobór azotu spowalnia wzrost roślin, skraca okres ich rozwoju wegetatywnego, przyspiesza starzenie i w znacznym stopniu obniża wydajność fotosyntetyczną chloroplastów [94]. Zawartość chlorofilu w organach asymilacyjnych w dużym stopniu jest uzależniona od właściwego zaopatrzenia roślin w azot [127,131,139,174]. Charakterystycznym objawem niedoboru azotu jest żółknięcie starszych liści spowodowane degradacją chlorofilu i przekazywaniem odzyskanych składników do liści młodszych [142]. Związek pomiędzy ilością azotu w roślinach, a zawartością chlorofilu w dojrzałych liściach jest podstawą wizualnej oceny zaopatrzenia roślin w azot. Metoda wizualnej oceny będąca z natury subiektywna i wymagająca dużego doświadczenia została zastąpiona przez spektrofotometryczny pomiar zawartości wyekstrahowanego chlorofilu. W celu ułatwienia pracochłonnych czynności przygotowawczych skonstruowano urządzenia do bezinwazyjnego pomiaru zawartości chlorofilu w liściach roślin [110]. Najczęściej używany jest miernik chlorofilu typu SPAD – 502 produkowany przez firmę Minolta Co. [22]. W licznych pracach udowodniono bezpośrednią zależność między zawartością azotu ogólnego w roślinach i zawartością chlorofilu, co uzasadnia zastosowanie tego rodzaju mierników do oceny stanu odżywienia roślin w azot oraz do ustalania wielkości dawek nawozów azotowych [139,142].

Efektywne pobieranie związków azotowych przez rośliny jest uwarunkowane jednoczesną podażą innych pierwiastków biogennych. Szczególną rolę spełnia **siarka**, którą rośliny pobierają zwykle w ilości ok. 7g na każde 100g przyswojonego azotu [163]. Niedobór jonów siarczanowych w glebie, nawet przy dostatecznym zaopatrzeniu w związki azotowe spowalnia wzrost roślin, wywołuje chlorozę młodszych liści, obniża sprawność fotosyntezy i zwiększa podatność chloroplastów na uszkodzenia fotoinhibicyjne [106,109,127]. Uzupełniające nawożenie siarką może przyczynić się nawet do trzykrotnego zwiększenia w liściach rzepaku zawartości glutationu, specyficznego tripeptydu pełniącego ważną rolę w ochronie chloroplastów przed skutkami stresu oksydacyjnego [58].

Wzrastające wymagania dotyczące ochrony środowiska oraz postęp technologiczny w dziedzinie oczyszczania spalin przemysłowych spowodowały tak znaczne zmniejszenie emisji SO_2 w Europie Zachodniej, że np. w RFN już kilkanaście lat temu pojawiła się konieczność uzupełniającego nawożenia upraw rzepaku związkami siarkowymi [59,157]. Również i w Polsce od kilku lat odnotowywany jest deficyt siarki, szczególnie na obszarach północno-zachodniej i w środkowej części kraju. Przeprowadzone w roku 1995 badania wykazały, że na dużej ilości plantacji rzepaku (nawet powyżej 50%) wystąpiły utajone niedobory tego pierwiastka [54]. W rejonach intensywnej uprawy rzepaku konieczne stało się uzupełniające nawożenie związkami siarki jako warunek uzyskania wysokiej

jakości oleju oraz wysokobiałkowej paszy [88]. Dobrze znane preparaty siarkowo - azotowe można zastąpić produktem nawozowym (ok. 90% siarczanu amonu i 10% azotanu amonu) uzyskiwanym ubocznie podczas jednoczesnego odsiarczania i odazotowania spalin kotłowych metodą radiacyjną [24,127,174].

2.2.3. Herbicydy – inhibitory fotosyntezy

W intensywnej gospodarce rolnej ważną rolę spełniają herbicydy, które umożliwiają skutecznie i w sposób mało pracochłonny zmniejszać zachwaszczenie na polach uprawnych. Chwastami określa się rośliny, które zasiedlają (zwykle od bardzo dawna) obszary obecnie użytkowane rolniczo. Ukształtowane według potrzeb człowieka rośliny uprawne w konkurencji z niezmodyfikowaną roślinnością endemiczną są z reguły na przegranej pozycji. We współczesnym rolnictwie europejskim choroby, szkodniki, a zwłaszcza zachwaszczenie (stanowiące często główny składnik strat) przyczyniają się do obniżenia plonów nawet o 30% [36]. Jedynie właściwa pielęgnacja mechaniczna oraz chemiczne niszczenie chwastów warunkują uzyskanie dobrych zbiorów.

Najczęściej stosowane są **herbicydy układowe** wnikające do roślin przez korzenie (h. doglebowe) lub poprzez epidermę liści (h. dolistne) i przemieszczające się w tkankach przewodzących wraz ze sokiem ksylemowym lub floemowym. Znajdujące się w handlu preparaty chwastobójcze zawierają składnik aktywny (**s.a.**), czyli herbicyd i tzw. adjuwanty, czyli substancje ułatwiające wnikanie cząsteczek herbicydów do wnętrza rośliny. Najczęściej stosowane są preparaty o działaniu **selektywnym**, które przy odpowiednio dobranej dawce efektywnie niszczą chwasty nie szkodząc roślinie uprawnej. Do takich preparatów zalicza się np. Pyramin (s.a. pyrazon) i Betanal (s.a. fenmedifan) stosowane do zwalczania chwastów w uprawach buraków, herbicydy triazynowe Gesaprim (s.a. atrazyna) i Azotop (s.a. symazyna) spełniające szczególną rolę w odchwaszczaniu kukurydzy, a także Sencor (s.a. metrybuzyna) stosowany do ochrony upraw ziemniaków i na plantacjach pomidorów.

Fitotoksyczność herbicydu polega na zdolności przyłączania się jego cząsteczek do białka będącego częścią enzymu lub spełniającego inną ważną rolę w procesach fizjologicznych zwalczanej rośliny (chwastu). Po przyłączeniu cząsteczki herbicydu do białka może nastąpić inaktywacja jego funkcji enzymatycznych, zakłócenie metabolizmu lub zmiana właściwości regulacyjnych w ważnych procesach życiowych (np. hormonalnej kontroli wzrostu i rozwoju rośliny). Niektóre herbicydy powodują hamowanie podziałów komórkowych, blokują FTE w aparacie fotosyntetycznym, zaburzają fosforylację oksydatywną, zakłócają biosyntezę karotenoidów, niektórych aminokwasów lub lipidów [36,45].

Bardzo ważną i liczną grupę herbicydów (ok. 30% wszystkich herbicydów układowych) stanowią inhibitory FTE, określane jako **inhibitory fotosyntezy**. Należą do nich: pochodne mocznikowe (linuron, monolinuron, chlortoluron, diuron i in.), triazyny (atrazyna, symazyna, metrybuzyna, prometryna i in.), pochodne diazyny (lenacyl, pyrazon i in.), karbaminiany (np. fenmedifan) i niektóre inne herbicydy o mniejszym znaczeniu [45]. Mechanizm ich działania polega na przyłączaniu swojej cząsteczki do białka D1 (32 kDa), z którym związany jest PQ_B będący akceptorem elektronów w PS II [36,188]. W konsekwencji przyłączenia cząsteczki herbicydu do D1 właściwości oksydoredukcyjne tego białka zmieniają się do tego stopnia, że szybkość przepływu strumienia fotowzbudzonych elektronów pomiędzy akceptorami PQ_A i PQ_B może zmniejszyć się nawet 20 krotnie [135]. W następstwie tego maleje wydajność fotofosforylacji niecyklicznej, a niedobór ATP hamuje asymilację CO_2 i zużycie NADPH. W takiej sytuacji maleje również podaż $NADP^+$ i w konsekwencji energia wzbudzonych elektronów w PS I ma większą szansę być przekazana na O_2 generując cząsteczki anionorodnika $O_2^{-\cdot}$ (bardzo aktywnego utleniacza). Zwiększona koncentracja $O_2^{-\cdot}$ w błonach tylakoidów przyczynia się do degradacji chlorofilu i może inicjować proces wolnorodnikowego utleniania lipidów membranowych [45].

W celu ujednolicenia oceny fitotoksyczności różnych substancji chwastobójczych wyznacza się współczynnik I_{50} definiowany jako wartość stężenia herbicydu (w $\mu mol\ s.a.\cdot dm^{-3}$ roztworu) blokującego w 50% wybrany proces metaboliczny kluczowy dla roślin. W przypadku herbicydów – inhibitorów fotosyntezy parametr I_{50} określa stężenie (w $\mu mol\ s.a.\cdot dm^{-3}$), powodujące 50% inhibicję FTE w izolowanych chloroplastach. Podobną rolę spełnia parametr pI_{50}, zdefiniowany jako odwrotność logarytmu dziesiętnego z I_{50} [36,45,198].

Zablokowanie przepływu elektronów w PS II powoduje wzrost natężenia stacjonarnej FL, wzrost wydajności F_0 oraz charakterystyczne zmiany w przebiegu IFL chlorofilu. Zmiany konformacyjne w budowie białka D1 spowodowane przyłączeniem do niego cząsteczki h. należącego do jednej z grup inhibitorów fotosyntezy modyfikują w znacznym stopniu kinetykę zaniku OL chlorofilu.

Wymienione modyfikacje, zarówno FL jak i OL chlorofilu wywołane działaniem herbicydów mogą być wykorzystywane do oceny fitotoksyczności znanych lub nowosyntetyzowanych preparatów chwastobójczych oraz do wykrywania pozostałości herbicydowych w glebie i wodzie [37,38,67,105,112,117,195]. Rejestracja zaniku OL i analiza zmian wartości L_D zostały również wykorzystane do badania odporności roślin uprawnych na herbicydy – inhibitory fotosyntezy [113,115,118,120,121].

Wieloletnie zwalczanie chwastów przy użyciu tych samych herbicydów (np. w uprawie kukurydzy, gdzie stosowane są herbicydy triazynowe) przy jednoczesnym ograniczeniu pielęgnacji mechanicznej, może wywołać zjawisko **kompensacji**, czyli masowego pojawienia się nowych gatunków chwastów odpornych na stosowaną dotąd substancję aktywną. Zjawisku temu można przeciwdziałać stosując specjalnie dobrane mieszanki herbicydów o rozszerzonym działaniu fitotoksycznym [2,147]. Innym, trudniejszym problemem jaki stworzyła powszechna chemizacja ochrony roślin jest pojawienie się, w obrębie znanych gatunków chwastów (*Senecio vulgaris, Amarantus retroflexus, Chenopodium album, Erigeron canadensis* i in.), nowych **genotypów odpornych na herbicydy** o wyspecjalizowanym mechanizmie działania [141,98,172]. Przeprowadzone badania ujawniły, że przyczyną powstałej odporności są mutacje genetyczne powstające samorzutne w nielicznych roślinach danego siedliska. W wyniku wieloletniego stosowania takich samych herbicydów nastąpiło wyselekcjonowanie odpornych genotypów. Znanych jest ponad 50 gatunków chwastów, w obrębie których wytworzyły się genotypy triazynoodporne.

Odporność na h. triazynowe wynika z mutacji genu chloroplastowego *psb* A, który koduje białko D1 (32 kDa) spełniające nie tylko ważną rolę przy transporcie elektronów w PS II, ale będące również miejscem przyłączania cząsteczek h. należących do kilku grup inhibitorów – fotosyntezy [71,140]. W rezultacie powstałej mutacji genomu, podczas syntezy D1 następuje pojedyncza zamiana aminokwasów np. seryny na alaninę lub też inne kombinacje [43,82]. Opisana modyfikacja D1 uniemożliwia lub poważnie utrudnia związanie się tego białka z cząsteczką h. triazynowego [98,135]. Odkrycie to nasunęło pomysł genetykom, aby wyhodować rośliny uprawne posiadające w taki sposób zmodyfikowany genom i tym samym wykazujące odporność na herbicydy triazynowe. Zamierzenie to doprowadziło do stworzenia triazynoodpornych odmian rzepaku Triton i Brutor [35,107,148].

Niestety, modyfikacja składu aminokwasów w D1 zmieniła do takiego stopnia jego właściwości oksydoredukcyjne w miejscu Q_B, że efektywność przekazywania elektronów pomiędzy akceptorami PQ_A i PQ_B znacznie się zmniejszyła. Defekt ten przyczynił się tym samym do wzrostu podatności roślin odmian triazynoodpornych na uszkodzenia fotoinhibicyjne [95,98,135]. Tłumaczy to również niższą wydajność fotosyntezy (nawet do 30%) obserwowaną zarówno u odpornych genotypów chwastów, jak i u pierwszych triazynoodpornych odmian rzepaku [48,115,148,173]. Późniejsze prace hodowlane pozwoliły na uzyskanie bardziej wydajnych genotypów, czego dowodem są rośliny należące

do dwuzerowych rodów rzepaku ozimego 5972/2/89 i 7841/1i/95 wyhodowane w Poznańskim Oddziale IHAR [118,121].

Anomalia w budowie cząsteczki D1 i związana z tym dysfunkcja akceptora PQ_B powodują zmiany w przebiegu IFL chlorofilu [118,146] oraz bardzo charakterystyczną modyfikację krzywej zaniku OL chlorofilu w roślinach triazynoodpornych, co umożliwia łatwą ich identyfikację [67,114,115,118,120].

2.2.4. Fotoinhibicja i stres oksydacyjny

Zjawisko fotoinhibicji występuje wówczas, gdy chloroplasty pochłoną więcej energii PAR niż są w stanie przetworzyć na energię chemiczną. Jednoczesny współudział innych czynników stresowych takich jak chłód, wysoka temperatura, niedobór CO_2, deficyt składników mineralnych, jony metali ciężkich i susza potęguje ujemne skutki tego zjawiska. Fotoinhibicja przejawia się w poważnych zakłóceniach procesu fotosyntezy, które mogą doprowadzić do zmian destrukcyjnych w tylakoidach. Wyniki wielu badań są zgodne, że PS II jest pierwotnym miejscem uszkodzeń aparatu fotosyntetycznego wskutek nadmiernego napromieniowania [27,85,90,123]. Fotoinhibicja jest najczęściej spowodowana przez zespół niekorzystnych czynników środowiska, a mechanizmy obronne i adaptacyjne roślin są w znacznym stopniu zróżnicowane. Z tego też względu nie można dokładnie określić wspólnej dla wszystkich roślin progowej wartości PPFD, przy której wystąpi fotoinhibicja [154,178].

W prawidłowo funkcjonującym aparacie fotosyntetycznym wzrost natężenia promieniowania PAR powoduje zwiększenie liczby wzbudzonych cząsteczek chlorofilu oraz innych barwników pomocniczych zlokalizowanych w zespołach barwnikowych obu fotosystemów. Energia tych lokalnych wzbudzeń dociera do centrum reakcji odpowiedniego fotosystemu (np. PS II), powodując pierwotny rozdział ładunków i wytworzenie pary rodnikowej: P^+_{680} Phe^-. Podczas intensywnego oświetlenia, gdy wzbudzone elektrony nie mogą być dostatecznie szybko przekazywane z Phe^- na PQ_A, może nastąpić rekombinacja pary P^+_{680} Phe^-, a wyzwolona energia zostaje przekazana na O_2, co powoduje przekształcenie tlenu w stanie trypletowym w bardziej reaktywną formę **tlenu singletowego** - $^1O_2$. Wytworzony tlen singletowy ma zdolność utlenienia P_{680} i tym samym destrukcji centrum reakcji PS II, a także może spowodować denaturację białka D1 [9,154].

W antenowych zespołach barwnikowych oprócz chlorofilu *a* i *b* znajdują się również **karotenoidy** spełniające rolę ochronną „wygaszając" aktywne stany trypletowe chlorofilu. Mają one także zdolność dezaktywacji $^1O_2$ i wolnych

rodników, które powstają podczas ekspozycji roślin na zwiększone natężenie światła [63,197]. Karotenoidy nie zawsze jednak zapewniają pełną ochronę kompleksów barwnikowych w warunkach silnego oświetlenia. Sytuacja staje się krytyczna, gdy szybkość generowanych stanów wzbudzonych w antenach barwnikowych (przekazywanych następnie na P_{680}) zrównuje się z maksymalną szybkością podaży elektronów z kompleksu rozkładu wody do centrum reakcji PS II. W takich warunkach cząsteczka P_{680} może utrzymywać się w stanie permanentnego utlenienia, a bardzo wysoki potencjał P^{+}_{680} (ok.+1100 mV) umożliwia utlenianie cząsteczek chlorofilu lub β karotenu w antenach barwnikowych powodując ich destrukcję [57,66].

Najczęściej zasadniczą przyczyną obniżenia aktywności PS II pod wpływem silnego światła jest inhibicja FTE oraz enzymatyczna degradacja D1 (przy udziale proteazy aktywowanej przez światło) [27,28,149]. Białko D1 może być uszkadzane zarówno przez wysoce aktywny $^{1}O_2$ generowany w centrum reakcji PS II, jak również przez rodniki plastochinonowe tj. Q_B^{-} i Q_B^{2-} powstające podczas FTE w makrokompleksie PS II. W wyniku autooksydacji rodniki te generują $O_2^{-\bullet}$ [96, 149, 154].

Spośród białek tworzących rdzeń PS II wyjątkowo intensywnej wymianie ulega D1 (ok. 50 razy częściej niż inne polipeptydy w tylakoidach). Szybkość tej wymiany (ang. *turnover* – degradacja i resynteza) może wzrosnąć nawet dziesiątki razy podczas silnego oświetlenia [28]. Możliwość sprawnej i szybkiej wymiany uszkodzonych makrocząsteczek białkowych przyspiesza proces restytucji aparatu fotosyntetycznego pozwalając na utrzymywanie jego aktywności nawet w warunkach umiarkowanego stresu świetlnego [66,154]. Innym efektem fotoinhibicji jest utrata aktywności fotochemicznej PS II spowodowana uszkodzeniem jego donorowej części, o czym świadczą jony manganu i białkowe elementy kompleksu rozkładu wody uwalniane do wnętrza tylakoidu [57,152,182].

Czynnikiem stresowym dla roślin, głównie szklarniowych i uprawianych pod osłonami, bywa niedomiar CO_2, a w pewnych przypadkach także i jego nadmiar. Obserwowany od kilkudziesięciu lat coraz szybszy wzrost stężenia CO_2 w atmosferze powoduje nie tylko zauważalne zmiany klimatyczne o zasięgu globalnym (związane z tzw. efektem szklarniowym), ale wkrótce będzie także bezpośrednio oddziaływał na proces fotosyntezy i tym samym na produktywność roślin uprawnych [133,171].

Dwutlenek węgla trzeba traktować jako gazowy nawóz będący niezbędnym substratem procesu fotosyntezy. Mimo, że jego stężenie w powietrzu przekroczyło już 0,037% to ilość dostępnego CO_2 pozostaje dość często czynnikiem ograniczającym produkcję roślinną. Dotyczy to szczególnie roślin ogrodniczych

uprawianych w szklarniach, gdzie w słoneczne dni stężenie CO_2 nierzadko spada do tzw. poziomu głodowego (100÷200 μmol(CO_2)·mol^{-1}). Tak znaczne obniżenie stężenia CO_2 (końcowego akceptora w procesie fotosyntezy) może w warunkach nawet niezbyt silnego napromieniowania spowodować poważne uszkodzenia fotoinhibicyjne [122,181].

Dla większości roślin uprawnych optymalne stężenie CO_2 wynosi ok. 800÷1000 μmol(CO_2)·mol^{-1} (w warunkach obfitego napromieniowania w zakresie PAR oraz właściwego nawożenia mineralnego!) i dlatego w nowoczesnych szklarniach coraz częściej instalowane są urządzenia wzbogacające powietrze w dwutlenek węgla. Dzięki tym urządzeniom można bardziej efektywnie wykorzystywać potencjalne możliwości roślin zwiększając ich plony nawet o 30% ÷ 40% [171,181]. Dodatkową zaletą zwiększonej podaży CO_2 jest zmniejszenie ubocznej produkcji $O_2^{-\bullet}$ w PS I. W takich warunkach komórki roślinne mogą jednak wykazywać tendencję do zmniejszenia udziału wydatkowanej energii na wytwarzanie osłony antyutleniającej co zwiększyłoby ich podatność na stres oksydacyjny [5,64]. Wyższe stężenie CO_2 wpływa na ograniczenie syntezy rubisco, bowiem w takich warunkach jego funkcja oksygenacyjna (odpowiedzialna za proces fotooddychania) ulega minimalizacji, a tym samym rośnie efektywność karboksylacji [171,182]. Rezygnacja z energochłonnej rozbudowy układu antyutleniającego oraz ograniczenie zasobów rubisco pozwala roślinie na inne rozdysponowanie „odzyskaną" energią chemiczną, np. na wzrost biomasy.

Badania wpływu silnego napromienienia PAR na strukturę i funkcje aparatu fotosyntetycznego są często prowadzone przy wykorzystaniu metod luminescencyjnych (pomiary FL i OL chlorofilu) na liściach roślin, zawiesinach mikroglonów i chloroplastów [44,86,123,128,149].

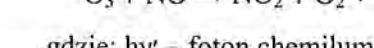
Stres oksydacyjny zagraża roślinom gdy w warunkach silnego napromieniowania PAR przestają wystarczać mechanizmy rozpraszania nadmiaru energii wzbudzenia, a systemy antyutleniające nie są w stanie zabezpieczać komórki roślinne przed szkodliwym działaniem tlenu (zwłaszcza w jego reaktywnych formach). W okresie letnim (silne nasłonecznienie i podwyższona temperatura) częstą przyczyną stresu oksydacyjnego są gazowe zanieczyszczenia powietrza, np.: węglowodory, tlenki azotu i siarki oraz ozon. W przyziemnej warstwie atmosfery O_3 jest wytwarzany w reakcjach fotochemicznych przy udziale tlenków azotu, tlenu oraz katalizatorów węglowodorowych np. propylenu [73]:

$$2NO + 2O_2 + C_3H_6 + h\nu \rightarrow 2NO_2 + CH_3CHO + HCHO$$

$$NO_2 + O_2 + h\nu \rightarrow NO + O_3$$

gdzie: $h\nu$ – foton inicjujący reakcję fotochemiczną (λ = 300 ÷ 400 nm).

Efektywność produkcji O_3 wzrasta w podwyższonej temperaturze, natomiast ciemność lub słabe światło i obniżona temperatura powietrza (np. typowe warunki wieczorne i nocne) sprzyjają reakcji rozkładu ozonu:



$$O_3 + NO \rightarrow NO_2 + O_2 + h\nu'$$

gdzie: $h\nu'$ – foton chemiluminescencji ($\lambda' = 600 \div 2400$ nm).

Ozon po wniknięciu do cytoplazmy komórek roślinnych ulega w ich wodnym środowisku przemianom, podczas których wytwarzane są także i inne RFT, jak: anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{-\cdot}$, tlen singletowy $^1O_2$, rodnik hydroksylowy $OH^{\cdot}$ i nadtlenek wodoru H_2O_2. Powoduje to początkowo wzrost aktywności oddychania, zmniejszenie intensywności asymilacji CO_2, i wzmożenie biosyntezy etylenu. W tkankach roślin wzrasta również akumulacja flawonoidów, poliamin i fitoaleksyn, a także rośnie zawartość związków o charakterze przeciwutleniającym jak: askorbinian, α-tokoferol, glutation i niektóre enzymy antyoksydacyjne. Takie zmiany właściwości i modyfikacje składu cytoplazmy należy traktować jako obronne lub przystosowawcze reakcje komórki w warunkach narastającego stresu oksydacyjnego. W dalszej kolejności następują zmiany w ultrastrukturze chloroplastów i zanik chlorofilu. Wpływa to na efektywność reakcji w fazie świetlnej fotosyntezy, np. kilkudniowa ekspozycja liści dyni na podwyższone stężenie ozonu (5 dni, 0,15 ppm O_3) zmniejszyła aktywność FTE o ok. 66% [187]. Ozon obniża aktywność rubisco oraz ogranicza ekspresję kilku kluczowych genów jądrowych, które są odpowiedzialne za prawidłowy przebieg fotosyntezy [6]. Po dłuższej ekspozycji roślin na działanie O_3 mogą spotęgować się wolnorodnikowe reakcje utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach biologicznych oraz pojawić się poważne zakłócenia w gospodarce wodnej rośliny. Podobne efekty wywołują również i inne gazowe zanieczyszczenia atmosfery pochodzące ze spalin samochodowych oraz emisji wielkoprzemysłowych jak np. tlenki azotu, nadtlenek benzyloazotanu i nadtlenek acetyloazotanu (**PAN**) tworzące wraz z ozonem tzw. **smog fotochemiczny** [73, 78, 103].

Bardzo wrażliwe na ozon i smog fotochemiczny są rośliny niektórych odmian tytoniu np. Bel W3. Rośliny tej odmiany tytoniu są znacznie bardziej wrażliwe na działanie ozonu (oraz innych gazowych utleniaczy jak np. SO_2 i NO_X) niż rośliny tytoniu odmian tolerancyjnych Bel-B lub Hawana. Już po 2 h ekspozycji roślin odm. Bel W3 na 0,06 ppm O_3 (przeciętne stężenie ozonu w troposferze wynosi ok. 0,03 ppm) można na liściach zaobserwować lokalne nekrozy w postaci brązowawych plamek. Podobny efekt na liściach tytoniu odm. Bel-B (w warunkach takiej samej ekspozycji) występuje dopiero przy stężeniu 0,22 ppm O_3 [4,65].

Należy, w tym miejscu zaznaczyć, że RFT takie jak: $^1O_2$, $OH^{\cdot}$, $O_2^{-\cdot}$ i H_2O_2 są wytwarzane podczas różnych reakcji fotochemicznych, radiochemicznych, a także podczas wyładowań elektrycznych i spalania substancji organicznych. Świadczy to o powszechnej obecności RFT w środowisku i należy je traktować, zarówno jako czynnik stresowy jak i część systemu alarmowo–sygnalizacyjnego, który wywołuje ekspresję odpowiednich genów modyfikujących metabolizm i mobilizujących mechanizmy obronne roślin w celu przezwyciężenia niekorzystnych warunków wegetacji [47,56].

Potencjalnie niebezpieczne dla roślin są także RFT wytwarzane ubocznie podczas niektórych procesów wewnątrzkomórkowych takich jak oddychanie mitochondrialne, fotosynteza, i reakcje w peroksysomach [11,111]. Dla roślin szczególnie groźne są zakłócenia procesu fotosyntezy spowodowane nadmiarem promieniowania PAR w połączeniu z innymi czynnikami stresowymi np. skażeniem atmosfery (ozon, rodniki nadtlenkowe, tlenki siarki i azotu), wysoką i niską temperaturą, suszą, UV-B, jonami ciężkich metali i herbicydami [56,78,179]. W wyniku nieprawidłowego przebiegu reakcji fotosyntezy spowodowanego przez różne czynniki stresowe lub mutacje genetyczne następuje wzmożona generacja RFT w chloroplastach i może zaistnieć stres oksydacyjny będący często sumaryczną reakcją rośliny na oddziaływanie całego kompleksu niekorzystnych czynników stresowych (tzw. multistresu).

Rośliny, podobnie jak i wszystkie inne żywe układy, wykształciły w toku ewolucji sprawny system antyoksydacyjny (AOA), którego celem jest minimalizacja negatywnych efektów wywołanych działaniem O_2. System antyoksydacyjny tworzą zarówno nieenzymatyczne jak i enzymatyczne przeciwutleniacze. Do pierwszej grupy należą: askorbinian (kwas askorbinowy, wit. C), glutation (GSH), α-tokoferol i β-karoten. Askorbinian i glutation pełnią rolę „zmiataczy" wolnych rodników powstających w hydrofilowej fazie chloroplastu, natomiast α-tokoferol oraz β-karoten mając charakter hydrofobowy stanowią ochronę fazy lipidowej zapobiegając: wolnorodnikowej peroksydacji lipidów w błonach tylakoidów, fotooksydacji cząsteczek chlorofilu oraz innym uszkodzeniom struktury i funkcji aparatu fotosyntetycznego [104,111].

Do enzymów o działaniu antyoksydacyjnym należą: dysmutazy ponadtlenkowe (w chloroplastach występują trzy formy: Fe-SOD, Mn-SOD oraz Cu,Zn-SOD), peroksydaza askorbinowa (APX), reduktaza dehydroaskorbinowa (DHAR) oraz reduktaza glutationowa (GR). Jak już wcześniej zaznaczono, w wyniku autooksydacji rodników chinonowych (efekt fotoinhibicji) może powstawać w chloroplastach $O_2^{-\cdot}$. Anionorodnik ponadtlenkowy może być także wytwarzany w PS I, gdy zredukowana

do bardzo niskiego potencjału ferredoksyna (E_m= - 420 mV) zamiast redukować $NADP^+$ do NADPH, przekazuje elektron na cząsteczkę tlenu:

$$2O_2 + 2Fd_{red} \rightarrow 2O_2^{-\cdot} + 2Fd_{ox}$$

gdzie: Fd_{red} i Fd_{ox} – ferredoksyna odp. w stanie zredukowanym i utlenionym.

Anionorodnik ponadtlenkowy łatwo wchodzi w reakcje oksydoredukcyjne (np. z askorbinianem, Fe^{3+}, Cu^{2+}), a także ulega dysmutacji tzn. utlenieniu jednej cząsteczki $O_2^{-\cdot}$ kosztem redukcji drugiej:

$$O_2^{-\cdot} + O_2^{-\cdot} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Reakcja dysmutacji może zachodzić spontanicznie, ale najczęściej jest katalizowana przez dysmutazy SOD (wyspecjalizowane enzymy oksydoredukcyjne). Taki przebieg reakcji oksydoredukcyjnych, w wyniku których likwidowany jest wysokoenergetyczny stan zredukowanej ferredoksyny, a powstający anionorodnik ponadtlenkowy ulega dysmutacji, określany jest jako **pseudocykliczny transport elektronów.** Podczas tych reakcji, podobnie jak podczas niecyklicznego transportu elektronów, protony przenoszone są z przestrzeni stromy do wnętrza tylakoidu podwyższając transbłonowy potencjał elektrochemiczny umożliwiający syntezę ATP. Opisany mechanizm (nazywany **reakcją Mehlera**) wykorzystywany jest w roślinach do regulacji szybkości asymilacji CO_2 i stanowi swoistą „klapę bezpieczeństwa" ochraniającą struktury aparatu fotosyntetycznego w warunkach fotoinhibicji [57,151]. Powstający nadtlenek wodoru jest redukowany do H_2O w tzw. **cyklu Halliwella–Asady** [15]:

$H_2O_2 \rightarrow$ ← askorbinian ← → glutation utleniony → ← NADPH

↓↓APX ↑↑DHAR ↓↓GR

H_2O ← →dehydroaskorb.→ ←glutation zredukow.← → $NADP^+$

Skuteczna eliminacja H_2O_2 oraz $O_2^{-\cdot}$ zarówno w chloroplastach, jak również i we wszystkich innych układach biologicznych jest szczególnie ważna, bowiem nadtlenek wodoru może reagować z $O_2^{-\cdot}$, wytwarzając silnie toksyczny rodnik hydroksylowy w tzw. **cyklu Fentona** [11]:

$$H_2O_2 + O_2^{-\cdot} \xrightarrow{Fe^{2+}/Fe^{3+}} OH^{\cdot} + OH^- + O_2$$

$$Fe^{3+} + O_2^{-\cdot} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

W cyklu Fentona rolę katalizatora spełniają najczęściej jony żelaza, ale mogą je zastąpić również jony miedzi i innych metali przejściowych: Co, Ni, Cr, i Mn.

Jednym z bardziej szkodliwych efektów stresu oksydacyjnego jest **peroksydacja** (nadtlenkowe utlenianie) lipidów wywołana przez RFT. W pierwszej fazie procesu peroksydacji (*inicjacji*) następuje oderwanie atomu wodoru od cząsteczki kwasu tłuszczowego (LH) w wyniku reakcji, z niektórymi rodnikami np. rodnikiem hydroksylowym [55]:

$$LH + OH^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + H_2O$$ gdzie: $L^{\bullet}$ to rodnik kwasu tłuszczowego.

W obecności O_2 następuje utlenienie $L^{\bullet}$ do $LOO^{\bullet}$, który może reagować z następną cząsteczką LH, a rezultatem tej reakcji jest LOOH oraz odtworzony rodnik $L^{\bullet}$. Następuje druga faza peroksydacji, którą cechuje ciąg reakcji łańcuchowych (lawinowych) i stąd jej nazwa - *faza propagacji*.

$$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$$ gdzie $LOO^{\bullet}$ to rodnik nadtlenkowy,

$$LOO^{\bullet} + LH \rightarrow L^{\bullet} + LOOH$$ gdzie LOOH to wodoronadtlenek.

Oprócz ciągu powyższych reakcji łańcuchowych, które rozprzestrzeniając się potęgują proces wolnorodnikowego utleniania lipidów, mają również miejsce i inne reakcje kończące *fazę propagacji*. Występują one w *fazie terminacji*. Najważniejsza z nich to rekombinacja rodników $LOO^{\bullet}$ z jednoczesnym wytworzeniem wzbudzonego produktu, który ulegając dezaktywacji promienistej emituje foton w widzialnym zakresie widma (jest to zjawisko chemiluminescencji):

$$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow LOOL^{*} + O_2$$

$$LOOL^{*} \rightarrow LOOL + h\nu_1$$

gdzie: $h\nu_1$ – foton chemiluminescencji ($\lambda = 450 \div 510$ nm).

Możliwe jest także utworzenie dimeru tlenu w stanie singletowym, który przechodząc do stanu tryplet owego, emituje nadwyżkę energii również w postaci fotonu chemiluminescencji:

$$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow L\text{-}L + [^1O_2]_2^{*}$$

$$[^1O_2]_2^{*} \rightarrow 2O_2 + h\nu_2$$

gdzie: $h\nu_2$ – foton chemiluminescencji; ($\lambda = 634$ nm).

Po fazie *inicjacji* mogą mieć miejsce jeszcze inne wolnorodnikowe reakcje będące źródłem chemiluminescencji, jednakże przedstawione wyżej reakcje rekombinacji rodników nadtlenkowych charakteryzują się najwyższą **wydajnością kwantową,** tzn. przy danej ilości reagujących cząsteczek wyemitowana jest największa ilość fotonów. Należy zaznaczyć, że sumaryczna wydajność kwantowa reakcji chemiluminescencyjnych zachodzących podczas peroksydacji lipidów w błonach biologicznych jest bardzo niska i zawiera się w granicach $10^{-10} \div 10^{-14}$, co odpowiada $10 \div 10^{5}$ fotonów·cm^{-2}·s^{-1} z powierzchni badanej tkanki, a detekcja tak słabych strumieni fotonów wymaga specjalnych technik fotometrycznych. Ten rodzaj specyficznej, bardzo słabej chemiluminescencji, która towarzyszy peroksydacji lipidów nazwano **ultrasłabą biochemiluminescencją** (UBCL) [168,169,184].

Peroksydacja fosfolipidów w błonach biologicznych jest szczególnie niebezpieczna. W początkowej fazie tego procesu powstają cząsteczki wodoronadtlenków (LOOH), a w fazie *terminacji* również i inne produkty, z których najlepiej poznany jest dialdehyd malonowy (MDA). Produkty peroksydacji zmieniają właściwości dwufazowej błony biologicznej, wywołując zakłócenia w przebiegu fosforylacji, pogarszając jej selektywną przepuszczalność, a także powodując zmniejszenie aktywności enzymów membranowych [11]. Z wcześniejszych rozważań wynika, że zjawisko UBCL można traktować jako objaw niesprawności przemian bioenergetycznych, a z analizy zmian intensywności UBCL można wnioskować o skuteczności ochrony struktur komórkowych przez system przeciwutleniający [169,184]. Przy określonych warunkach pomiaru wzrost natężenia UBCL jest oznaką narastania stresu oksydacyjnego, a monitorowanie zmian wydajności tej luminescencji może być dogodnym narzędziem badawczym, które dostarcza informacji o dynamice procesów wolnorodnikowych oraz skuteczności mechanizmów przeciwutleniających [1,193].

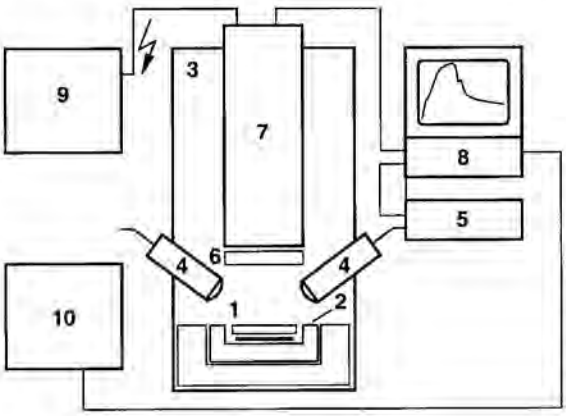
Stres oksydacyjny można w wielu przypadkach traktować jako wypadkowy efekt oddziaływania całego zespołu czynników niekorzystnie wpływających na wzrost i rozwój roślin, a genetycznie uwarunkowany potencjał mechanizmów przeciwutleniających jako warunek umożliwiający roślinie przezwyciężenie warunków stresowych [47,56,104].

3. METODY I URZĄDZENIA POMIAROWE

3.1. Pomiary luminescencji chlorofilu

3.1.1. Rejestracja indukcji fluorescencji chlorofilu

Indukcja fluorescencji (IFL) chlorofilu była rejestrowana przy pomocy uniwersalnego fluorymetru, sterowanego przez komputer PC z kartą przetwornika A/C. Fluorymetr został wykonany według mojego projektu, w Zakładzie Fizyki AR w Szczecinie.



Rys. 7. Schemat zestawu do rejestracji indukcji fluorescencji chlorofilu. Szczegółowe informacje w opisie zestawu.
Fig. 7. Chlorophyll fluorescence induction recording set. Details in the text.

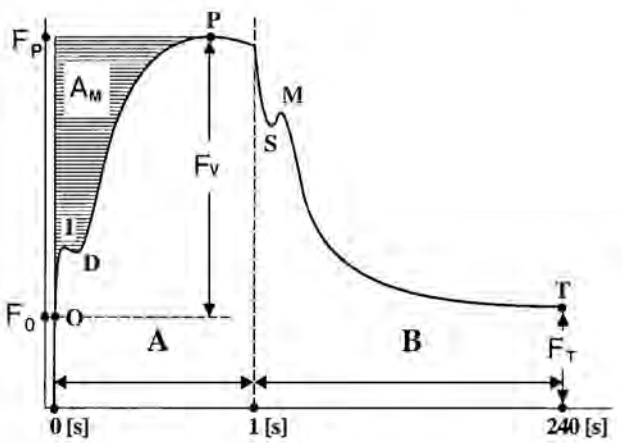
Opis zestawu do rejestracji indukcji fluorescencji: 1 – krążek liściowy nakryty płytką szklaną, 2 – światłoszczelna kaseta, 3 – kamera pomiarowa, 4 – oświetlacz diodowy (LED, $\lambda_{max} = 660$ nm), 5 – zasilacz oświetlacza, 6 – filtr graniczny ($\lambda > 690$ nm), 7 – fotopowielacz, 8 – mikrokomputerowy programator i sterownik pomiaru, 9–zasilacz wysokiego napięcia, 10 – drukarka.

Opis metody pomiarowej

Pomiary wykonywano najczęściej na krążkach liściowych o średnicy od 7 mm do 13 mm (Rys. 7). Krążki umieszczano się na powierzchni wilgotnego papieru w światłoszczelnej kasecie, nakrywano szklaną płytką i zasłaniano. Przeciętna seria pomiarowa liczy od 6 do 10 obiektów. Po ok. 20 minutach ciemniowej adaptacji, kasety z krążkami liściowymi były kolejno umieszczane w wyciemnionej kamerze pomiarowej. Po odsłonięciu krążka liściowego zostaje on oświetlony skoncentrowaną wiązką promieniowania czerwonego (λ_{max}= 660 nm; PPFD 125 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, na poziomie krążka) emitowanego przez diody elektro-

luminescencyjne i jednocześnie następuje rejestracja IFL chlorofilu. Cyklem pomiarowym steruje program komputerowy, a zmiany natężenia FL chlorofilu można obserwować w czasie rzeczywistym na ekranie monitora (8). Czas trwania pomiaru, jego podział na fazy oraz częstotliwości odczytów natężenia FL można programować indywidualnie.

Typowy cykl pomiarowy (Rys. 8) obejmuje: fazę szybką – A, trwającą 1080 ms i fazę wolną – B, zakończoną po 240 s. Fazę A rozpoczyna pierwszy punkt pomiarowy (na krzywej indukcji oznaczony jako O) zarejestrowany po upływie 30 μs od momentu włączenia oświetlenia. Wartość tego pomiaru można traktować jako fluorescencję zerową (F_0), ponieważ po upływie tak krótkiego czasu nie mogły pojawić się jeszcze żadne efekty związane z reakcją fotochemiczną i transportem elektronów w PS II. Fluorescencja zerowa jest w głównej mierze wynikiem straty części energii wzbudzenia podczas jej migracji w kompleksach chlorofilowo-białkowym (LHC i LHC II) nazywanych także antenami energetycznymi. W normalnych, fizjologicznych warunkach energia wzbudzeń elektronowych trafia prawie w całości (ponad 95%) do centrum reakcji PS II, gdzie inicjuje rozdział ładunków [część 2.1]. Po rejestracji F_0 następuje 180 kolejnych odczytów dokonywanych co 6 ms. W fazie B pomiary FL następują co 1 s. Pełny przebieg IFL chlorofilu (Rys. 8.) po znormalizowaniu względem wartości szczytowej F_P, jest uwidoczniony na ekranie monitora (8). Przebieg IFL może być także wydrukowany i zapisany w pamięci komputera. Korzystając z programu komputerowego, można otrzymywać uśrednione przebiegi IFL chlorofilu dla całej badanej serii. Na podstawie charakteru tego przebiegu można wnioskować o niektórych cechach aparatu foto-



Rys. 8. Przykładowy przebieg krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu. A – faza szybka, B - faza wolna. Opis w tekście.
Fig. 8. Exemplary chlorophyll fluorescence induction curve. A - fast phase, B - slow phase. Description in the text.

syntetycznego, sprawności reakcji fazy świetlnej fotosyntezy, a także o potencjalnej aktywności fotosyntetycznej badanych roślin [część 2.1.1].

Najważniejszych informacji dostarczają następujące parametry indukcji fluorescencji chlorofilu:

- **F_V/F_P** – szczytowa (≈ maksymalna) efektywność reakcji fotochemicznej w PS II (wyznaczona po adaptacji ciemniowej, $F_V/F_P \approx F_V/F_M$);
- **F_V/F_0** – szczytowa efektywność reakcji rozkładu wody na donorowej stronie PS II (wyznaczona po adaptacji ciemniowej);
- **A_M** – powierzchnia nad krzywą IFL, wartość parametru proporcjonalna do wielkości puli niezredukowanych akceptorów elektronów (głównie plastochinonów) w PS II;
- **Rfd** = $(F_P-F_T)/F_T$ – wskaźnik witalności informujący o współdziałaniu reakcji fazy świetlnej z reakcjami fazy ciemnej (cyklem Calvina); miernik potencjalnej aktywności fotosyntetycznej w danych warunkach świetlnych;
- F_0 – fluorescencja zerowa, wskaźnik strat energii wzbudzenia podczas jej przekazywania z anten energetycznych do centrum reakcji PS II;
- $F_V = F_P - F_0$ – fluorescencja zmienna (wyznaczona po adaptacji ciemniowej);
- F_P – fluorescencja szczytowa wyznaczona po adaptacji ciemniowej, wartość F_P jest zbliżona do wartości F_M (maksymalnej);
- F_T – fluorescencja stacjonarna (w stacjonarnej fazie fotosyntezy).

Wszystkie wyszczególnione powyżej parametry oraz inne informacje o przebiegu IFL chlorofilu są wyświetlane wraz z krzywą indukcji na monitorze komputera.

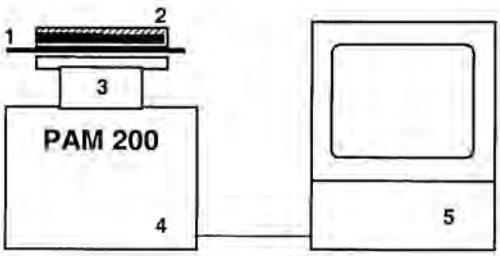
3.1.2. Pomiar wygaszania fluorescencji chlorofilu przy użyciu fluorymetru impulsowego PAM 200

Fluorymetry z modulowanym impulsowo promieniowaniem wzbudzającym fluorescencję F_0 i wykorzystujące impulsy światła nasycającego (system **PAM**), pozwalają na szybką i wnikliwą ocenę wydajności przetwarzania energii zaabsorbowanych fotonów PAR na energię chemiczną. Przy użyciu tego typu fluorymetrów można określać także wartość tej części energii wzbudzenia chlorofilu, która nie została wykorzystana w procesie fotosyntezy.

Opis zestawu pomiarowego (Rys.9): 1-liść, 2-krążek magnetyczny do unieruchomienia badanego obiektu (np. liścia), 3-głowica pomiarowa, 4-jednostka kontrolno-pomiarowa, 5- komputer.

Opis metody pomiarowej

Pomiary przeprowadzano na krążkach liściowych lub całych liściach, które umieszczano na głowicy pomiarowej przyciskając krążkiem magnetycznym. Dołączone do fluorymetru oprogramowanie pozwala wybrać żądaną opcję pomiarową [160]. Najczęściej stosowano tryb pomiaru z wykorzystaniem dwóch impulsów nasycających. Schemat przebiegu takiego pomiaru przedstawiono na Rys. 10.



Rys. 9. Schemat zestawu do pomiaru fluorescencji chlorofilu przy pomocy fluorymetru impulsowego PAM 200 (Walz; Effeltrich, Niemcy).

Fig. 9. Chlorophyll fluorescence analysis set with pulse fluorometer PAM 200 (Walz; Effeltrich, Germany).

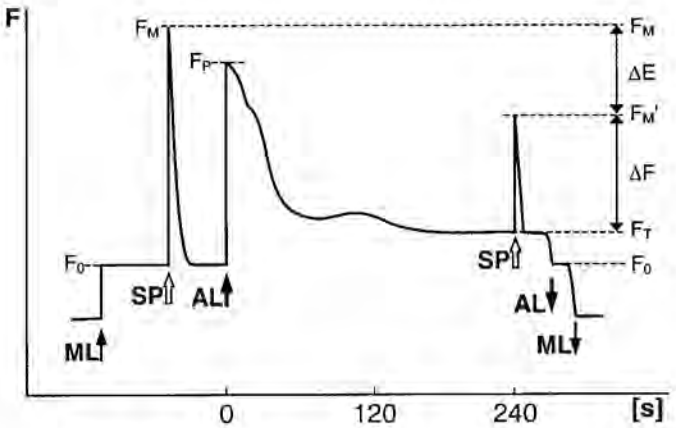
Pomiar zostaje rozpoczęty przez włączenie zmodulowanego impulsowo bardzo słabego światła (PPFD 0,04 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, na poziomie liścia) promieniowania - ML wzbudzające FL chlorofilu. Źródłem ML są diody elektroluminescencyjne tzw. LED, emitujące promieniowanie w czerwonym zakresie widma (λ_{max} = 650 nm). Promieniowanie to jest tak słabe, że nie wywołuje efektów indukcyjnych w liściach, a wzbudzona FL chlorofilu pochodzi głównie ze strat powstałych podczas migracji energii wzbudzenia w antenach energetycznych i dlatego można przyjąć, że jej wartość odpowiada F_0.

W następnej kolejności włączony zostaje krótki (0,8 s) i silny impuls światła (LED, λ_{max}= 665 nm; PPFD 3500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) określany jako nasycający - SP. Pod wpływem tego impulsu następuje redukcja wszystkich akceptorów elektronów w PS II i chwilowe zablokowanie reakcji fotochemicznej. Efektem tego jest skokowy i krótkotrwały wzrost wydajności FL chlorofilu znajdującego się w badanej próbce. Natężenie FL osiąga wówczas maksymalną (w warunkach adaptacji ciemniowej) wartość F_M.

Po kilku sekundach, gdy FL chlorofilu obniży się do poziomu F_0, następuje włączenie ciągłego światła aktynicznego (LED, λ_{max}= 665 nm) - AL. Natężenie AL można ustalać od 20 do 1800 μmol (fotonów, PAR)$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Wybierano wartość 180 μmol (fotonów, PAR)$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, a czas pomiaru 4 min.

Po włączeniu AL następuje szybki wzrost FL (podobnie jak po SP), osiągając wartość F_P, szczytową dla danego natężenia AL. Jeżeli F_P osiąga wartość mniej-

szą od F_M to znaczy, że proces fotosyntezy nie uległ maksymalnemu zablokowaniu (nasyceniu). Przez następne kilka minut wydajność FL zmniejsza się (przebieg podobny do krzywej IFL na Rys. 8), osiągając poziom stacjonarny F_T. Osiągnięcie poziomu F_T jest jednoznaczne z zakończeniem procesu uruchamianiem kolejnych etapów fotosyntezy (fotofizycznego, fotochemicznego i biochemicznego). Od tej chwili mamy do czynienia ze zrównoważonym przebiegiem wszystkich etapów fotosyntezy.



Rys. 10. Zmiany wydajności fluorescencji chlorofilu w liściu podczas pomiaru metodą nasycających impulsów światła (PAM 200, Walz). Szczegółowy opis w tekście.

Fig. 10. Changes in leaf chlorophyll fluorescence efficiency during measurement with saturating light pulses (PAM 200; Walz). Details in text.

Po upływie 240 s, od chwili rozpoczęcia pomiaru (taki czas wystarcza do osiągnięcia poziomu F_T), włączony zostaje drugi impuls **SP**, który tak samo jak poprzedni doprowadza do redukcji akceptorów elektronów w PS II i chwilowego zablokowania (nasycenia) reakcji fotochemicznej w tym fotosystemie, z tą różnicą, że następuje to w obecności światła aktynicznego AL. Pod wpływem tego impulsu następuje przejściowy wzrost FL do poziomu F'_M, niższego od poziomu F_M. Różnica poziomów F_M i F'_M jest efektem wygaszania FL wskutek mechanizmów o charakterze niefotochemicznym. Dane uzyskane podczas pomiarów FL pozwalają na wyliczenie kilku bezwymiarowych parametrów, opisujących istotne cechy fazy świetlnej fotosyntezy przy danym poziomie AL.

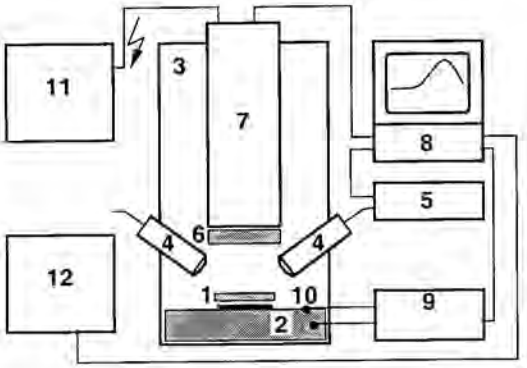
Zastosowany program pozwala wyznaczyć:

- **F_V/F_M** – maksymalną efektywność reakcji fotochemicznej w PS II (wyznaczoną po relaksacji ciemniowej, przy całkowitej redukcji akceptorów w PS II),
- **Y** = $(F'_M - F_T)/F'_M$ - maksymalna wydajność konwersji energii fotonów PAR na energię chemiczną w danych warunkach świetlnych (przy danej wartości AL),
- **ETR** = Y·(napromieniowanie PAR)·0,42 - efektywność transportu elektronów w PS II,
- **qP** = $(F'_M - F_T)/(F'_M - F_0)$ - współczynnik wygaszania FL chlorofilu na drodze fotochemicznej,
- **qN** = $(F_M - F'_M)/(F_M - F_0)$ - współczynnik wygaszania FL na drodze niefotochemicznej,
- F_0 – fluorescencja zerowa, wskaźnik strat energii wzbudzenia podczas jej przekazywania z anten energetycznych do centrum reakcji PS II,
- F_M – fluorescencja maksymalna (wyznaczona przy całkowitej redukcji akceptorów w PS II w warunkach adaptacji ciemniowej),
- $F_V = F_M - F_0$ – fluorescencja zmienna (po adaptacji ciemniowej),
- F'_M – fluorescencja maksymalna (przy danej wartości AL),
- F_T – fluorescencja chlorofilu w stacjonarnej fazie fotosyntezy (przy danym natężeniu promieniowania aktynicznego AL).

3.1.3. Wyznaczanie termogramów fluorescencji chlorofilu

Podwyższając temperaturę badanego fragmentu liścia, można zarejestrować charakterystyczny przebieg zmian wydajności fluorescencji zerowej - F_0 (Rys.12). Wzrost temperatury powyżej pewnej wartości progowej (T_P) powoduje wzrost F_0, co świadczy o zwiększeniu strat energii wzbudzenia w „antenach" barwnikowych wywołanych zapoczątkowaną denaturacją kompleksu białkowo-barwnikowego w PS II [część 2.1.1]. Rejestracja termogramów F_0 przy wzrastającej temperaturze pozwala szybko i w dogodny sposób wyznaczać T_P, tj. maksymalną temperaturę, w której nie następuje jeszcze obniżenie efektywności reakcji fazy świetlnej fotosyntezy na jej etapie fotofizycznym, a także temperaturę T_M informującą o termalnej destrukcji makrokompleksu PS II [162,185,145].

Termogramy FL chlorofilu były rejestrowane przy pomocy zestawu fluorymetrycznego sterowanego przez komputer PC z kartą przetwornika A/C. Zestaw fluorymetryczny został wykonany według mojego projektu, w Zakładzie Fizyki AR w Szczecinie.

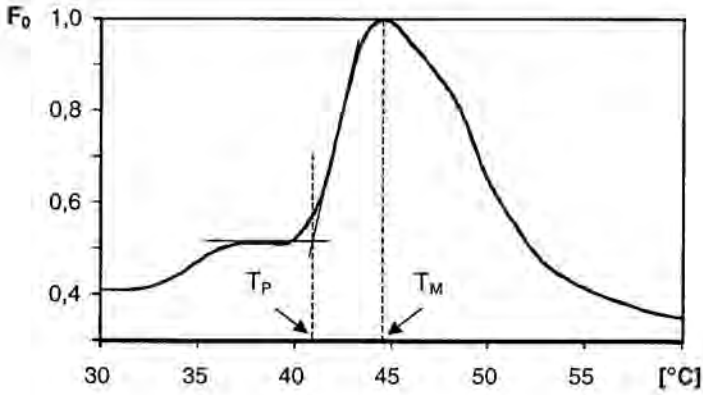


Rys. 11. Schemat zestawu do wyznaczania termogramów fluorescencji chlorofilu. Objaśnienia w opisie zestawu.
Fig. 11. Set for assaying chlorophyll fluorescence thermograms. Description in text.

Opis zestawu do wyznaczania termogramów fluorescencji chlorofilu: 1 – krążek liściowy, 2 – stolik grzejny, 3 – kamera pomiarowa, 4 – oświetlacz (LED; λ_{max}=660 nm), 5 – zasilacz oświetlacza, 6 – filtr graniczny (λ > 690nm), 7 –fotopowielacz, 8 – komputerowy sterownik pomiaru, 9 – termostat stolika grzejnego, 10 – termometr elektryczny, 11 – zasilacz wysokiego napięcia, 12 – drukarka.

Opis metody pomiarowej

Termogramy F_0, w zakresie od 30°C do 70°C były rejestrowane przy użyciu specjalnego zestawu pomiarowego (Rys. 11.). Krążek liściowy umieszczano w światłoszczelnej kamerze na powierzchni stolika grzejnego i nakrywano szklaną płytką. Temperatura stolika była stabilizowana, a jej zaprogramowany wzrost kontrolowany przez termostat z termometrem elektrycznym. Początkowa temperatura stolika wynosi 30°C ± 0,5°C. FL jest wzbudzana przez oświetlacz diodowy emitujący promieniowanie (λ_{max} = 660 nm) o małej intensywności (PPFD 0,6 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Po włączeniu programu pomiarowego następuje liniowy wzrost temperatury (1°C/20 s) stolika i położonego na nim krążka. Jednocześnie następuje detekcją F_0 przez układ fotometryczny. Sygnał prądowy z fotopowielacza jest przekazywany do przetwornika A/C w komputerze, gdzie następuje jego rejestracja. Termogramy są normalizowane względem ich maksymalnej wartości - T_M (Rys. 12). Ze znormalizowanego termogramu wyznaczana jest wartość T_P. Termogram może być wydrukowany i zapisany w pamięci komputera.



Rys. 12. Przykładowy termogram liścia. T_P – temperatura progowa, T_M – temperatura maksymalna. Opis termogramu w tekście.

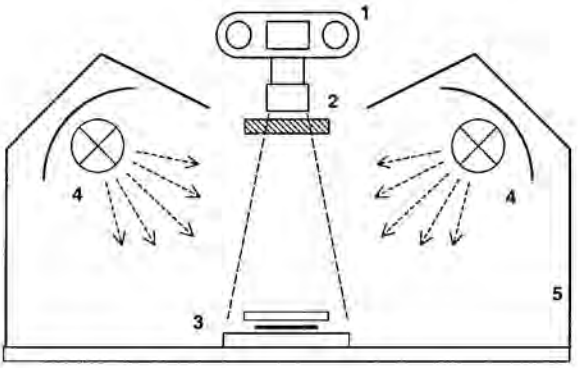
Fig. 12. Typical thermogram of a leaf. T_P - threshold temperature, T_M – maximal temperature. Description in text.

3.1.4. Fotograficzna rejestracja zmian wydajności fluorescencji chlorofilu

Wydajność stacjonarnej FL chlorofilu rejestrowanej podczas fotosyntezy zależy od natężenia PAR, zmienia się w procesie ontogenezy rośliny i jest uzależniona od wpływu różnych czynników stresowych zakłócających przebieg reakcji fotosyntezy. Na wzrost wydajności FL szczególnie silnie wpływa blokada FTE w PS II np. pod wpływem herbicydów - inhibitorów fotosyntezy [część 2.2.3].

Wydajność FL chlorofilu w normalnie fotosyntetyzujących tkankach roślinnych wynosi od 0,5% do 5% [część 2.1.1.]. Czerwono zabarwione liście można obserwować „gołym" okiem, gdy chlorofil zostanie wzbudzony krótkofalowym promieniowaniem optycznym np. z fioletowej części widma. Stosując metodę tzw. filtrów skrzyżowanych, otrzymuje się wyraźny, chociaż dosyć słaby obraz fotosyntetyzujących tkanek roślinnych, który można zarejestrować przy użyciu techniki fotograficznej. Na Rys. 13 przedstawiono schemat stanowiska do fotograficznej rejestracji FL chlorofilu w tkankach roślinnych.

Opis stanowiska do fotografowania fluorescencji tkanek roślin: 1 – aparat fotograficzny, 2 – filtr graniczny ($\lambda > 690$ nm), 3 – liść lub jego fragment, 4 – niskoprężne lampy sodowe ($\lambda_{max} = 589$ nm), 5 – obudowa.



Rys. 13. Schemat stanowiska do fotografowania fluoryzujących tkanek roślin.
Objaśnienia w opisie stanowiska.
Fig. 13. Set for fluorescent plant tissue photography. Description in text

Opis metody pomiarowej

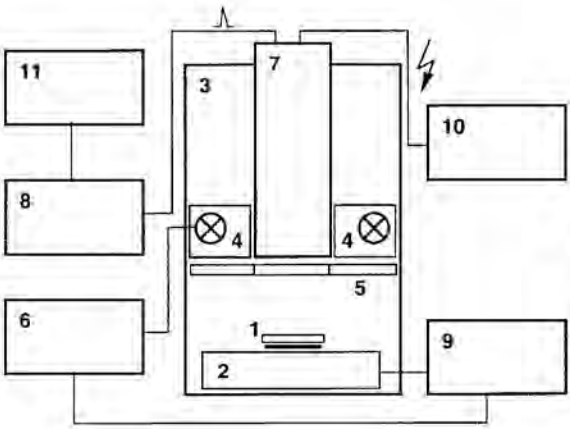
Badany liść lub jego fragment umieszczano pod płytką ze szkła organicznego na wyczernionym stoliku pod aparatem fotograficznym. Jeżeli zaplanowana była seria zdjęć wykonywanych w dłuższych odstępach czasu (np. co 30 min.), to łodyżki liści zanurzano w wodzie lub wodnych roztworach np. herbicydów. Fluoryzujące tkanki liści fotografowano przy pomocy aparatu fotograficznego Practica L na wysokoczułej (30 DIN, 800 ASA), czarno-białej, panchromatycznej błonie fotograficznej T 800 FOMAPAN (prod. Foma Bohemia, Czechy). Typowe warunki ekspozycji: otwór względny obiektywu 4, czas naświetlania 2 s.

3.1.5. Pomiar zaniku opóźnionej luminescencji chlorofilu

Do detekcji OL służy specjalny luminometr o wysokiej czułości, z fotopowielaczem czułym w zakresie dalekiej czerwieni (do ok. 740 nm). Rejestrowana luminescencja jest bardzo słaba (ok. 1000 krotnie słabsza od FL chlorofilu) i emitowana w paśmie od 680 nm do ok. 740 nm. W luminometrze zastosowano metodę zliczania impulsów jednoelektronowych, która pozwala na detekcję pojedynczych fotonów. Metoda ta jest niewątpliwie bardziej złożona od rejestracji fotoprądu (metody stosowanej we fluorymetrach oraz w większości fotometrów), jednak jest konieczna do detekcji bardzo słabych sygnałów świetlnych. Luminometr wraz z układem do rejestracji zaniku OL chlorofilu został wykonany według mojego projektu, w Zakładzie Fizyki AR w Szczecinie.

Opis zestawu do rejestracji opóźnionej luminescencji chlorofilu: 1 – krążek liściowy nakryty płytką szklaną, 2 – szuflada ze stolikiem na badane próbki i baterią termoelektryczną, 3 – światłoszczelna kamera pomiarowa, 4 – oświetlacz,

5 – przesłona mechaniczna, 6 – programator cyklu pomiarowego i zasilacz oświetlacza, 7 – fotopowielacz z przedwzmacniaczem, 8 – przelicznik, 9 – zasilacz baterii termo-elektrycznej, 10 – zasilacz wysokiego napięcia, 11 – drukarka.



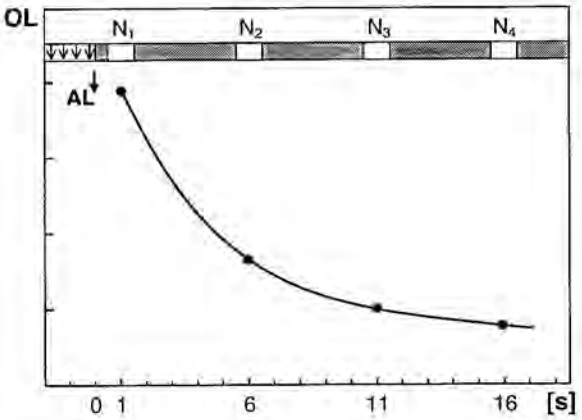
Rys. 14. Schemat zestawu do rejestracji zaniku opóźnionej luminescencji chlorofilu.

Fig. 14. Recording set for chlorophyll delayed luminescence decay. Description in text.

Opis metody pomiarowej

Pomiary mogą być wykonywane na całych liściach, ich fragmentach (np. krążkach). Krążek liściowy nakrywano szklaną płytką i umieszczano na powierzchni stolika termostatowanego przy pomocy baterii termoelektrycznej w szufladzie, którą wsuwano do wnętrza światłoszczelnej kamery pomiarowej (Rys. 14). Na początku pomiaru przesłona znajduje się w położeniu, przy którym odsłonięte są żarówki oświetlacza i jednocześnie zasłonięty fotopowielacz. Po włączeniu programatora następuje załączenie oświetlacza, który napromieniowuje (PPFD 120 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, na poziomie stolika) badaną próbkę roślinną przez 12 s. Następnie, w ciągu 0,5 s mechaniczna przesłona zasłania żarówki oświetlacza odsłaniając jednocześnie fotokatodę fotopowielacza. Od tej chwili rozpoczyna się rejestracja OL, emitowanej z uprzednio napromieniowanej próbki.

Ze względu na bardzo małe natężenie zanikającej OL w mierzonym zakresie (do kilkunastu sekund), ciągły pomiar fotoprądu zastąpiono cyklicznym pomiarem tzw. sum świetlnych np.: 1 s pomiaru i 4 s przerwy. Rezultatem pomiaru jest ciąg sum świetlnych (N_1, N_2, N_3, N_4,...) zliczanych przez przelicznik. Każda z tych sum jest proporcjonalna do liczby fotonów wyemitowanych w tym czasie przez próbkę roślinną, zatem ciąg sum N_1, N_2, N_3, N_4,... obrazuje kinetykę zaniku OL (Rys. 15).



Rys. 15. Przykład przebiegu krzywej zaniku opóźnionej luminescencji chlorofilu. Objaśnienia w tekście.

Fig. 15. Example of chlorophyll delayed luminescence decay curve. Description in text.

Analizowano następujące parametry OL chlorofilu:

- N_S – wartość pierwszego pomiaru (N_1; od 0,5 s do 1,5 s) proporcjonalna do składowej sekundowej,
- N_D – wartość czwartego pomiaru (N_4; od 15,5 s do 16,5 s) proporcjonalna do składowej dekasekundowej,
- $L_D = (N_D/N_S) \cdot 1000$; – bezwymiarowy parametr informujący o szybkości zaniku OL, a pośrednio o sprawności transportu elektronów pomiędzy pierwotnym (PQ_A) i wtórnym (PQ_B) stabilnym akceptorem elektronów w PS II.

3.2. Pomiar ultrasłabej biochemiluminescencji

Ultrasłaba biochemiluminescencja (UBCL) była rejestrowana przy użyciu wysokoczułego luminometru działającego w układzie zliczania impulsów jednoelektronowych. Detektorem fotonów, w tym luminometrze jest fotopowielacz EMI 9558B (prod. Thorn EMI Electron Tubes Ltd., W. Brytania), posiadający fotokatodę wieloalkaliczną, o czułości spektralnej od 320 nm do 800 nm. Fotokatoda fotopowielacza jest chłodzona do temperatury -20°C przy użyciu chłodziarki termoelektrycznej. Luminometr został wykonany według mojego projektu, w Zakładzie Fizyki AR w Szczecinie.

Opis metody pomiarowej

Metoda zliczania impulsów jednoelektronowych (nazywana również metodą kwantometryczną) zastosowana do rejestracji bardzo słabych świeceń wymaga użycia fotopowielaczy o wysokiej czułości i charakteryzujących się bardzo małym prądem „ciemnym" (niską emisją termoelektronów z powierzchni fotokatody).

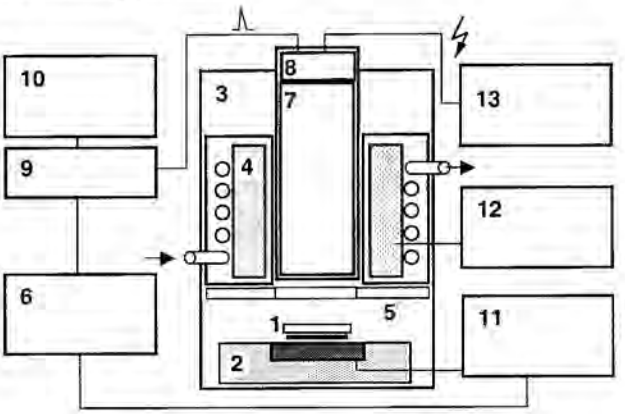
W celu obniżenia emisji termoelektronów należy schładzać fotokatodę, np.: przy użyciu zestalonego dwutlenku węgla, chłodziarek sprężarkowych lub chłodziarek termoelektrycznych. Ochłodzenie fotokatody od temperatury 20°C do -20°C zmniejsza emisję termoelektronów ok. 100 razy. Fotopowielacz wraz ze wzmacniaczem impulsowym zapewnia bardzo wysoki współczynnik wzmocnienia (ok. 10^6-10^7) co pozwala rejestrować impulsy generowane przez pojedyncze fotoelektrony wyemitowane z fotokatody. Liczba zliczonych impulsów jest więc proporcjonalna do liczby fotonów padających na fotokatodę fotopowielacza. Możliwość rejestracji pojedynczych fotonów emitowanych przez badane obiekty jest równoznaczna z osiągnięciem granicy maksymalnej czułości przy pomiarach sygnałów świetlnych.

Po uwzględnieniu geometrii komory pomiarowej, wydajności spektralnej fotokatody i po odjęciu impulsów prądu „ciemnego" (skutek emisji termoelektronów), można wyznaczyć gęstość strumienia emitowanych fotonów z badanej próbki. Wartość mierzonych sygnałów UBCL najczęściej przekraczała od 4 do 9 razy wartość prądu „ciemnego". Pomiar UBCL tkanek asymilacyjnych np. fragmentów blaszek liściowych musi być poprzedzony dość długim okresem ich „wyświecania", czyli umieszczenia ich w ciemności aż do całkowitego zaniku OL chlorofilu.

Opis zestawu do pomiaru ultrasłabej bioluminescencji: 1 – krążek liściowy (lub inny obiekt biologiczny) nakryty płytką ze szkła organicznego, 2 – szuflada z termostatowanym stolikiem na badane próbki biologiczne (zakres od 30°C do 80°C z dokładnością ± 0,5°C), 3 – światłoszczelna kamera pomiarowa, 4 – chłodziarka termoelektryczna (elementy Peltiera) wraz z chłodnicą wodną, 5 – płyta termoizolacyjna z oknem ze szkła organicznego, 6 – programator cyklu pomiarowego, 7 – fotopowielacz, 8 – przedwzmacniacz impulsowy, 9 – przelicznik, 10 – drukarka, 11 – zasilacz termostatowanego stolika, 12 – zasilacz chłodziarki termoelektrycznej, 13 – zasilacz wysokiego napięcia.

Pojedynczą próbkę stanowił zwykle fragment liścia o powierzchni ok. 6 cm^2, który umieszczano na powierzchni wody w szalce Petriego. Serię (od 6 do 10 sztuk) tak przygotowanych próbek adaptowano do ciemności w temperaturze pokojowej przez ok. 50 minut. Po tym czasie próbki przenoszono (przy bardzo słabym zielonym świetle) na powierzchnię termostatowanego stolika (30°C ± 0,5°C), nakrywano płytką ze szkła organicznego, a następnie wsuwano szufladę ze stolikiem do kamery pod fotokatodę fotopowielacza (Rys. 16). Po 2 min. inkubacji próbki na powierzchni termostatowanego stolika, wykonywano 20-sekundowy pomiar sumy, wszystkich zarejestrowanych przez układ detekcyjny impulsów jednoelektronowych. Na sumę tą składa się tzw. prąd „ciemny" fotopowielacza oraz suma

impulsów fotoelektronowych proporcjonalna do natężenia UBCL badanej próbki. Po pomiarze usuwano próbkę i wykonywano pomiar (również przez 20 s) aktualnej wartości prądu „ciemnego". Różnicę wartości tych dwóch pomiarów przyjmowano jako miarę UBCL badanej próbki.



Rys. 16. Schemat zestawu do pomiaru ultrasłabej biochemiluminescencji. Objaśnienia zamieszczono w opisie zestawu.

Fig. 16. Ultraweak biochemiluminescence measurement set. Description in text.

3.3. Pomiary konduktometryczne

Konduktometryczna metoda oceny odporności roślin na stresy abiotyczne należy do metod niespecyficznych i dlatego jest stosowana w różnych dziedzinach badań. Przy pomocy tej metody można określać uszkodzenia struktur komórkowych wywołane mrozem, suszą, wysoką temperaturą, smogiem fotochemicznym i innymi czynnikami stresowymi. Opis konduktometrycznej metody oceny uszkodzeń tkanek roślinnych pierwszy opublikował Dexter i współprac. [39]. Metoda ta była udoskonalana przez kolejnych badaczy [99,137]. Wnętrze komórki roślinnej jest w znacznym stopniu wypełnione wodnym roztworem różnorodnych substancji organicznych i nieorganicznych. Duża część tych związków jest zdysocjowana, co powoduje, że sok komórkowy jest dosyć dobrym przewodnikiem prądu elektrycznego. Nieuszkodzona błona komórkowa przepuszcza cząsteczki wody do wnętrza komórki, natomiast stanowi praktycznie szczelną barierę dla cząsteczek substancji rozpuszczonych w soku komórkowym. Im większy jest stopień uszkodzenia błon przez niekorzystne czynniki zewnętrzne, tym większa część zawartości komórki wypłynie do otaczającej wody, zwiększając jej przewodnictwo.

Opis metody pomiarowej

Metoda konduktometryczna pozwala ocenić uszkodzenia struktury błon komórkowych oraz utratę zdolności do kontrolowanej i selektywnej przepuszczalności roztworów wodnych. W celu oceny odporności błon na uszkodzenia przez czynniki stresowe, z liści badanych roślin, zarówno grupy kontrolnej – **K** jak i poddanej działaniu czynników stresowych – **P**, wycinano kilkucentymetrowe fragmenty blaszek liściowych, które po opłukaniu w wodzie destylowanej umieszczano w probówkach. Do wszystkich probówek wlewano po 15 cm^3 wody bidestylowanej, której przewodnictwo nie przekraczało 1,8 μS. Fragmenty liści zostały całkowicie zanurzone w wodzie (20°C) i pozostawione na 4 godziny w ciemności.

Po upływie 4 h probówki wyjmowano z termostatu i wykonywano pomiar przewodnictwa roztworów wodnych we wszystkich probówkach przy użyciu konduktometru (np. N5711 prod. Teleko, Polska). Następnie probówki wraz z zawartością zanurzano na 10 minut do wrzącej wody w celu całkowitego zniszczenia struktur komórkowych w badanych fragmentach liści. Po ochłodzeniu roztworów do temperatury 20°C (oraz ich uzupełnieniu do pierwotnej objętości 15 cm^3), następował powtórny pomiar ich przewodnictwa. Z uzyskanych wyników pomiarów obliczano **wskaźnik uszkodzeń (k)**.

$$k = \frac{G_P/G_{PZ} - G_K/G_{KZ}}{1 - G_K/G_{KZ}}$$

G_P – średnia wartość przewodnictwa wycieków z tkanek liści należących do grupy P,

G_{PZ} – średnia wartość przewodnictwa wycieków z tkanek liści należących do grupy P po zagotowaniu,

G_K – średnia wartość przewodnictwa wycieków z tkanek liści należących do grupy K,

G_{KZ} – średnia wartość przewodnictwa wycieków z tkanek liści należących do grupy K po zagotowaniu.

3.4. Pomiary wymiany gazowej przy użyciu analizatora LCA – 4

Gazoanalizator podczerwieni LCA-4 (ADC Bioscentific Ltd., W. Brytania) służy do jednoczesnego mierzenia stężenia CO_2 oraz pary wodnej w powietrzu przepływającym przez kuwetę pomiarową PCL-4. Wykorzystując układ kondy-

cjonowania, można modyfikować i ustalać pożądane poziomy stężenia CO_2 i pary wodnej w powietrzu doprowadzanym do kuwety. LCA-4 umożliwia również pomiary innych ważnych wielkości fizycznych jak: gęstości strumienia fotosyntetycznie czynnych fotonów – PPFD [$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$] mierzonej na poziomie liścia w kuwecie, względnej i bezwzględnej wilgotności powietrza w kuwecie, jego temperatury, a dodatkowo można również zmierzyć zewnętrzne ciśnienie oraz stężenie CO_2 w otaczającym powietrzu. Wartości wybranych parametrów (po zaprogramowaniu przez użytkownika) są wyświetlane na ekranie analizatora i zapisywane na wymiennej karcie pamięci. Dane z tej karty można przekazać do pamięci komputera i wydrukować.

Opis pomiaru

Wszystkie pomiary wymiany gazowej były wykonywane w układzie otwartym. Powietrze dostarczano przewodem z zewnątrz budynku [stężenie CO_2 ok. 370 $\mu mol(CO_2) \cdot mol^{-1}$, temperatura 18°C ÷ 24°C]. Pomiary wykonywano na liściach, które nie oddzielano od roślin rosnących w pojemnikach z piaskiem lub glebą. Poddana badaniom powierzchnia liści (ograniczona powierzchnią kuwety PLC-4) wynosi maksymalnie 6,25 cm^2. Temperaturę powietrza w kuwecie utrzymywano w granicach 20°C ÷ 22°C.

Przy użyciu gazoanalizatora LCA-4 mierzono:

- **natężenie fotosyntezy netto** – A [$\mu mol(CO_2) \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$],
- **intensywność transpiracji** – E [$mmol(H_2O) \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$],
- **przewodnictwo szparkowe** – g_S [$mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$].

Podczas pomiarów liście roślin były oświetlane (PPFD 700 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) przez zestaw należący do TL-A3 [część 3.7]. Wyniki odczytywano z ekranu LCA-4 po upływie 6 minut od początku pomiaru.

3.5. Pomiar zawartości chlorofilu przy użyciu miernika SPAD - 502

Miernik SPAD-502 (prod. Minolta Co. Ltd., Japonia) służy do bezinwazyjnego pomiaru zawartości **chlorofilu** w miękiszu liściowym przy pomocy metody optycznej [22,139,142]. Miniaturowy fotometr SPAD-502 wyposażony jest w dwa diodowe źródła promieniowania, w przybliżeniu monochromatycznego. Jedna dioda emituje światło czerwone w zakresie maksymalnej absorpcji przez chlorofile (λ_{max} = 650 nm), natomiast druga dioda promieniuje w zakresie podczerwonym (λ_{max} = 940 nm), w którym barwniki fotosyntetyczne już nie absorbują. Pomiar polega na umieszczeniu liścia pomiędzy nieruchomą a ruchomą częścią głowicy i lekkim

ściśnięciu blaszki liściowej. W tym momencie emitowany jest krótki impuls promieniowania czerwonego pochłanianego zarówno przez barwniki chlorofilowe, jak i przez pozostałe elementy struktury blaszki liściowej. Po nim następuje impuls promieniowania podczerwonego, które jest absorbowane wyłącznie przez niechlorofilowe elementy struktury blaszki liściowej. SPAD-502 wyposażony jest w element pamięci oraz w mikroprocesor, co pozwala na wykonanie operacji odjęcia od wartości pierwszego pomiaru, wartość drugiego. Otrzymany wynik jest wyświetlany w postaci cyfrowej, w tzw. jednostkach **SPAD** (zakres od 0 do 800). Wartość odczytanego wyniku jest proporcjonalna do zawartości chlorofilu w badanym obszarze (6 mm^2) liścia [110].

Opis pomiaru

Po włączeniu zasilania należy docisnąć obie części głowicy (bez liścia) w celu wyzerowania przyrządu. Następnie można wykonywać pomiary zawartości chlorofilu liści, tak jak to opisano poprzednio. W celu uzyskania bardziej reprezentatywnej informacji o zawartości chlorofilu, na każdym badanym liściu wykonuje się serię pomiarów (zwykle od 6 do 10), wówczas uzyskany wynik będzie wartością średnią dla serii. Otrzymane wartości w jednostkach SPAD mają charakter umowny i nie przedstawiają bezwzględnej zawartości chlorofilu przeliczonej na jednostkę powierzchni lub na jednostkę masy blaszki liściowej. W szeregu opublikowanych pracach wykazano, że zachodzi wysoka korelacja ($r > 0,93$) pomiędzy zawartością chlorofilu wyznaczoną metodą spektrofotometryczną (poprzez pomiar absorbancji chlorofilu) i jego oceną, dokonaną na tych samych liściach przy użyciu SPAD-502 [142]. Ustalono, że 1 jednostka SPAD odpowiada 0,08 mg chlorofilu ogólnego na 1 dm^2 powierzchni liścia rzepaku, grochu lub tytoniu [166].

3.6. Pomiary pomocnicze i opisy przyrządów pomiarowych

3.6.1. Pomiar gęstości strumienia fotonów przy użyciu fitofotometru FF-01

Koniecznym warunkiem zaistnienia fotosyntetycznej konwersji energii jest absorpcja fotonów PAR przez specjalne kompleksy (anteny energetyczne) zbierające światło (np. LHC, LHC I i LHC II) zawierające chlorofil *a* i *b* oraz cząsteczki barwników pomocniczych [część 2.1.1]. Widmo absorpcji zespołu takich kompleksów jest podobne do widma czynnościowego fotosyntezy obejmującego zakres od ok. 400 nm do 700 nm [31].

Wydajność procesu fotosyntezy, tak jak i innych procesów fotobiologicznych jest uzależniona od liczby zaabsorbowanych fotonów i dlatego właściwym sposo-

bem pomiaru PAR jest pomiar **gęstości strumienia fotonów fotosyntetycznie czynnych** – PPFD [32]. Jednostką PPFD jest [$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$], czyli 10^{-6} mola fotonów z zakresu PAR padających w ciągu 1 s na 1 m^2 powierzchni np. liścia. Do pomiarów PPFD służą specjalne mierniki wyposażone w czujniki kwantowe [30]. Przykładem takiego miernika jest, wykorzystywany w tej pracy, fitofotometr FF- 01.

Opis fitofotometru FF-01

Fitofotometr FF-01 (prod. Sonopan, Polska) jest przeznaczony do pomiarów PPFD w promieniowaniu słonecznym lub emitowanym przez sztuczne źródła światła. Znajduje on zastosowanie w fizjologii roślin, produkcji roślinnej oraz agrometeorologii. FF-01 jest wyskalowany w $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, gdzie symbol E (jednostka obecnie już rzadziej używana) oznacza mol fotonów w określonym zakresie widma. W tym przypadku zakres ten pokrywa się widmem czynnościowym fotosyntezy [1 μE = 1 μmol(fotonów), z zakresu PAR]. Zakres pomiarowy FF-01 wynosi od 0 do 5000 [$\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$] w podzakresach: 5, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000 [$\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]. Maksymalna wartość PPFD promieniowania słonecznego w Polsce, mierzona latem w południe wynosi ok. 2200 [$\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$].

W praktyce wykorzystuje się następujące przeliczenia:

$1\ \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1} = 1\ \mu mol(\text{fotonów PAR}) \cdot m^{-2} \cdot s^{-1} = 6{,}02 \cdot 10^{17}(\text{fotonów PAR}) \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

W przybliżeniu można przyjąć, że 1 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ światła słonecznego odpowiada natężeniu promieniowania: 0,22 W(PAR)$\cdot m^{-2}$ lub natężeniu oświetlenia 50 lx. Taka sama wartość PPFD uzyskana z lamp rtęciowo-fluorescencyjnych odpowiada: 0,21 W(PAR)$\cdot m^{-2}$ i 70 lx, natomiast z wysokoprężnych lamp sodowych wynosi odpowiednio: 0,20 W(PAR)$\cdot m^{-2}$ i 60 lx [30].

3.6.2. Pomiar stężenia CO_2 przy użyciu miernika AirTECH – 2500

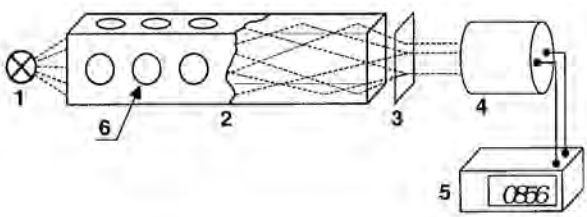
Dwutlenek węgla występujący w ilościach śladowych (ok. 0,037%) jest niezwykle ważnym składnikiem atmosfery będąc niezbędnym nawozem gazowym dla roślin oraz głównym gazem szklarniowym. Ekofizjologiczne badania wpływu zwiększającego się stężenia CO_2 w atmosferze na wzrost oraz rozwój roślin wymagają użycia małych, dokładnych i tanich mierników zawartości tego gazu.

W celu maksymalizacji produkcji ogrodniczej coraz częściej stosuje się w szklarniach i tunelach foliowych dokarmianie roślin dwutlenkiem węgla, co wymaga zastosowania aparatury monitorującej i dozującej CO_2. Do niedawna analizatory dwutlenku węgla (np. gazoanalizatory typu Infralyt lub URAS wykorzystywane do pomiarów fotosyntezy oraz oddychania) przedstawiały pokaźnych rozmiarów instalacje, w których znajdowały się układy wymrażające i osuszające

badane powietrze ponieważ do detekcji promieniowania podczerwonego (analizowane pasmo absorpcji 2,6 μm - 2,8 μm) stosowano modulatory mechaniczne, a całość wymagała bardzo dokładnej stabilizacji cieplnej oraz częstej kalibracji układu detekcyjnego. Wszystkie te wymagania sprawiały, że omawiane analizatory gazu były kłopotliwe w użytkowaniu, a uzyskiwanie powtarzalnych wyników pomiarów przysparzało sporo trudności co hamowało ich upowszechnienie. Sytuacja zmieniła się, gdy firma AirTECH wprowadziła na rynek nową generację analizatorów CO_2.

Opis miernika stężenia CO_2 typu AirTECH-2500 (prod. AirTECH, USA)

Przykładem miernika wykorzystywanego w do ustalania i kontroli stężenia CO_2 np.w komorach klimatycznych jest miernik typu AirTECH-2500 (w wersji dyfuzyjnej). Mierniki tego typu (Rys. 17) są przeznaczone do ciągłej kontroli stężenia CO_2 np. w szklarniach, fitotronach, browarach, pomieszczeniach klimatyzowanych (ze względu na małe rozmiary mierniki mogą być umieszczane bezpośrednio w przewodach wentylacyjnych). Analizowane powietrze przenika w wyniku dyfuzji do komory pomiarowej przez specjalną folię (6) posiadającą mikrootwory o wielkości ok. 10 nm.



Rys. 17. Schemat ideowy miernika CO_2 (AirTECH – 2500) w wersji dyfuzyjnej. Objaśnienia w tekście.
Fig. 17. Draft scheme of diffusive CO_2 gauge (AirTECH – 2500). Description in text.

Zasadniczą zaletą tego typu mierników jest ich niewrażliwość na obecność pary wodnej w analizowanym środowisku gazowym, co uwalnia od kłopotliwej konieczności stosowania urządzeń wymrażających i osuszających doprowadzane powietrze. Osiągnięto to dzięki zastosowaniu specjalnego filtru interferencyjnego (3) przepuszczającego tylko wąskie pasmo promieniowania podczerwonego (λ_{max} = 4,25 µm), które jest pochłaniane przez CO_2, a będące odległe od pasm absorpcji przez parę wodną (λ = 2,74 µm oraz λ = 6,3 µm). Przed komorą pomiarową (2) umieszczone jest źródło promieniowania podczerwonego (1), a z drugiej strony półprzewodnikowy detektor (4). Mierniki tego typu charakteryzuje dobra powtarzalność (±1%) i dokładność pomiaru (±5%) przy szerokim zakresie pomiarowym (0-10000 μmol(CO_2)·mol^{-1}, czyli 0-1,0000% CO_2). Wskazania są

odczytywane na czteropozycyjnym czytniku (5), co 1 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$. Odczyty można rejestrować analogowo, numerycznie lub przekazywać do pamięci komputera. Jest możliwe także ustalenie poziomu oraz histerezy alarmu. Trwałość miernika wynosi minimum 5 lat.

3.6.3. Pomiary powierzchni liści przy użyciu analizatora DIAS

Pomiary powierzchni badanych liści wykonywano przy użyciu analizatora DIAS (prod. Delta-T Devices Ltd., W. Brytania). Analizator rejestruje obraz liści przy pomocy kamery wizyjnej na matrycy półprzewodnikowej. Obraz ten zostaje następnie przetworzony przez przetwornik analogowo-cyfrowy przyłączony do sterującego komputera. Specjalny program komputerowy DIAS umożliwia wyświetlenie na monitorze wyniku pomiaru powierzchni analizowanych liści.

3.7. Termoluminostaty

Uprawę roślin przeznaczonych do badań prowadzono najczęściej w termoluminostatach, które zostały wykonane według moich projektów w Zakładzie Fizyki AR w Szczecinie. W pracy wykorzystywano 3 wersje termoluminostatów:

A. termoluminostat z pojedynczym źródłem światła – TL-1 (Rys. 18),
B. termoluminostat z zestawem oświetleniowym – TL-A3 (Rys. 18),
C. termoluminostat z regulowanym stężeniem CO_2 – TL-RDW (Rys. 19).

Opis techniczny termoluminostatów

TK – komora termoluminostatu (zaadaptowana zamrażarka np. typu MORS, o pojemności 80 dm^3), regulacja temperatury od (8 ± 1)°C do (40 ± 1)°C, całkowita wymiana gazu w komorze co 40 min., poziom 350 ppm CO_2 utrzymano z dokładnością ± 8%, poziom 700 ppm CO_2 utrzymywano z dokładnością ± 5%;

DP – dopływ powietrza spoza budynku, F – filtr powietrza (mechaniczny);

RG – regulator przepływu gazu, P – pompa rotacyjna, W – wentylator;

M – miernik stężenia CO_2 (AirTECH – 2500 w wersji dyfuzyjnej; opis budowy i działania w części 3.6.2);

T – termometr kontaktowy (0 ÷ 100°C);

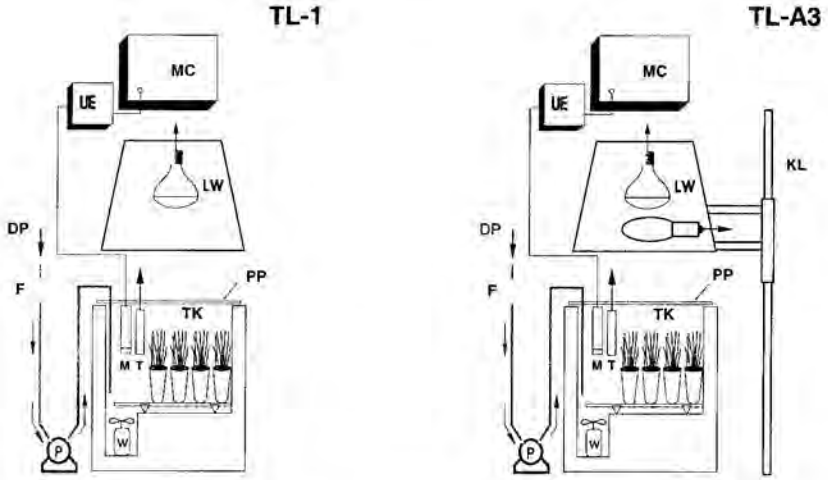
PP – pokrywa komory ze szkła organicznego lub ze szkła typu „antisol";

ZEM – elektromagnetyczny zawór gazowy, UE – układ elektroniczny do regulacji i kontroli wybranego poziomu CO_2 w TK;

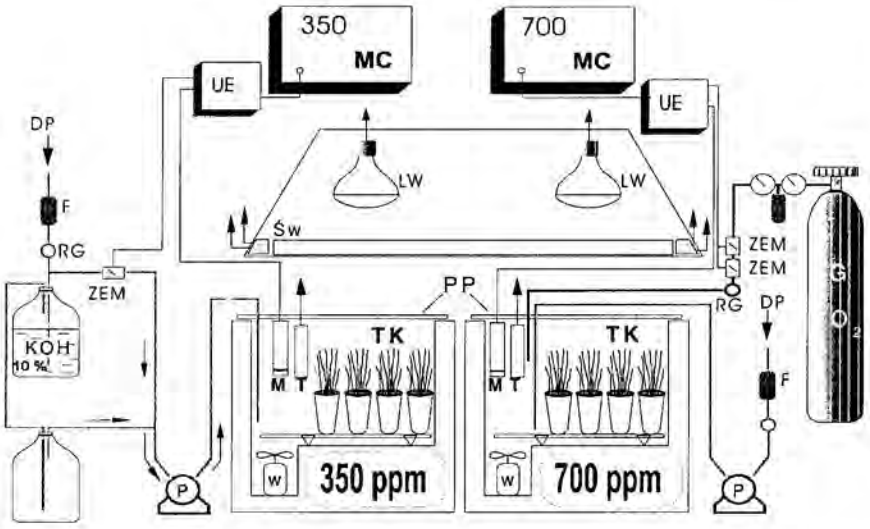
MC – miernik cyfrowy wyświetlający aktualne stężenia CO_2 w TK;

BG – butla gazowa, Św. – świetlówki;

LW – wysokoprężne lampy (sodowe lub rtęciowo - fluorescencyjne).



Rys. 18. Termoluminostat z pojedynczym źródłem światła – TL-1 oraz termoluminostat z agregatem oświetleniowym (3 lampowym) – TL-A3. Objaśnienia w opisie technicznym.
Fig. 18. Thermoluminostate with a single source of light, TL-1, and with aggregated lighting (3 lamps),TL-A3. Description in text.



Rys. 19. Termoluminostat z regulowanym stężeniem CO_2 – TL-RDW. Objaśnienia w tekście opisu technicznego.
Fig. 19. Thermoluminostate with regulated CO_2 concentration, TL-RDW. Description in the text.

Termoluminostat z zestawem oświetleniowym TL-A3 (Rys. 18) różni się od TL-1 większą liczbą lamp używanych do napromieniowania roślin w ustalonej temperaturze. W zestawie zainstalowano 2 lampy sodowe (WLS 400 W) i 1 rtęciową (LRFR 400 W). Zestaw ten może przesuwać się wzdłuż pionowej kolumny (KL), co umożliwia jego umieszczenie na dowolnej wysokości nad poziomem szklanej pokrywy. Przy minimalnej wysokości (15 cm) można uzyskać PPFD 950 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ na poziomie roślin.

Termoluminostat TL-A3 służył do kilkugodzinnego (zwykle 2 h lub 4 h) napromieniowania roślin lub ich fragmentów w określonej temperaturze. Badania tego rodzaju przeprowadzano w celu oceny odporności roślin na uszkodzenia fotoinhibicyjne. ZO-3 był także wykorzystywany jako regulowane źródło promieniowania PAR podczas pomiarów wymiany gazowej roślin przy użyciu LCA – 4.

Opis regulacji stężenia dwutlenku węgla w TL-RDW

Badając wpływ podwójnie zwiększonego stężenia dwutlenku węgla na wzrost i rozwój roślin, przyjęto poziom 700 $\mu mol(CO_2) \cdot mol^{-1}$ jako podwyższony oraz poziom 350 $\mu mol(CO_2) \cdot mol^{-1}$ jako kontrolny. W okresie przeprowadzanych badań stężenie CO_2 w pobieranym powietrzu z zewnątrz zmieniało się od ok. 360 do 390 $\mu mol(CO_2) \cdot mol^{-1}$. W celu utrzymania stałych warunków pomiaru został zaprojektowany i wykonany w Zakładzie Fizyki dwukomorowy termoluminostat z regulowanym stężeniem dwutlenku węgla TL-RDW (Rys. 18).

Powietrze z zewnątrz budynku jest zasysane przez pompę membranową (P) z wydajnością 2 $dm^3 \cdot (60\ s)^{-1}$. Powietrze, po przejściu przez wstępny filtr przeciwpyłowy (F) i regulator przepływu (RG) jest doprowadzone do butli z 10% roztworem KOH pochłaniającym CO_2, a następnie doprowadzane do wnętrza TK [komora z 350 $\mu mol(CO_2) \cdot mol^{-1}$]. Gdy stężenie dwutlenku węgla wewnątrz komory osiągnie wartość niższą od 340 $\mu mol(CO_2) \cdot mol^{-1}$ (ustaloną jako dolny próg histerezy miernika M) to układ UE spowoduje otwarcie zaworu ZEM. Powietrze przepływa wówczas do TK z pominięciem absorbenta z roztworem KOH. Gdy stężenie CO_2 wzrośnie powyżej 360 $\mu mol(CO_2) \cdot mol^{-1}$ (górny próg histerezy M) to zawór ZEM zostanie zamknięty, a strumień zasysanego powietrza przepływa znowu przez roztwór KOH i zubożone w CO_2 jest doprowadzane do wnętrza komory.

Dolny próg histerezy miernika CO_2 umieszczonego w drugiej TK [z 700 $\mu mol(CO_2) \cdot mol^{-1}$] jest ustawiony na poziom 690 $\mu mol(CO_2) \cdot mol^{-1}$. Gdy stężenie CO_2 w komorze obniży się poniżej tego poziomu (np. na skutek rozcieńczania przez powietrze doprowadzane z zewnątrz i w wyniku asymilacji dwutlenku węgla

przez badane rośliny), sygnał z M uruchomi otwarcie zaworów ZEM na okres 0,5 s. W czasie tego krótkotrwałego otwarcia zaworów z butli BG przepływa do wnętrza TK ok. 2 cm^3 CO_2. Dopóki stężenie dwutlenku węgla w komorze nie przekroczy 720 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$ (górny próg histerezy), co 20 s będą powtarzane impulsy prądowe otwierające zawory dozując dopływ nowych porcji CO_2.

Zmieniając wysokość zawieszenia zestawu oświetlającego i stosując różne źródła światła, można uzyskiwać w komorze, na poziomie roślin PPFD od 50 do 550 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$.

Opis źródeł światła wykorzystywanych w termoluminostatach

Przy uprawie roślin w termoluminostatach wykorzystywano lampy rtęciowo – fluorescencyjne oraz sodowe. Właściwy rozwój roślin (szczególnie młodych) wymaga dopływu promieniowania niebieskiego i z tego też względu korzystne jest stosowanie lamp LRFR 400 (przeznaczonych dla potrzeb doświetlania roślin), które emitują znaczną część swojej energii promienistej w zakresie fioletowym i niebieskim.

Dolna, spłaszczona część szklanej bańki tej lampy jest przezroczysta, natomiast górna jej część została od wewnątrz pokryta luminoforem. Wewnątrz lampy umieszczony jest kwarcowy palnik z niewielką ilością rtęci, w którym wytwarzany jest łuk elektryczny zasilany z sieci prądu zmiennego przez statecznik. Podczas przepływu prądu przez zjonizowane pary rtęci emitowane jest promieniowanie w kilku liniach widma. W zakresie PAR są to linie: 577 nm (żółto-zielona), 546 nm (zielona), 436 nm (niebieska) i 405 nm (fioletowa). Promieniowanie to przenika dobrze zarówno przez szkło bańki jak i przez płyty (ze szkła organicznego lub „antisolu") przykrywające komory termoluminostatów. Łuk rtęciowy emituje także kilka linii w zakresie ultrafioletu (254 nm, 313 nm, 350 nm i 363 nm), które przenikają przez szkło kwarcowe palnika, ale są pochłaniane przez zwykłe szkło bańki lampy. Promieniowanie z tego zakresu wzbudza fluorescencję luminoforu, który został naniesiony na górną, wewnętrzną część bańki. Wzbudzony luminofor emituje promieniowanie w pomarańczowo-czerwonej części widma (od 600 nm do 700 nm), które pokrywa się z długofalowym maksimum absorpcji chlorofilu (ok. 650 nm). Zastosowany luminofor dopasowuje widmo promieniowania lampy do potrzeb fotosyntezy. W lampach rtęciowych istotną rolę spełnia promieniowanie krótkofalowe (linie 436 nm i 405 nm), które powoduje wzbudzenie chlorofilu w obszarze jego drugiego maksimum (ok. 435 nm) oraz spełnia ważną rolę fotomorfogenetyczną [31].

Lampy typu LRFR są niekiedy zastępowane przez wysokociśnieniowe lampy sodowe np. WLS 400 lub SHC 400. W palniku lampy sodowej głównym źródłem światła są rozgrzane pary sodu emitujące promieniowanie żółto–pomarańczowe (λ_{max} = 589 nm). Silnie rozgrzana rurka palnika emituje dodatkowo promieniowanie termiczne w czerwieni i podczerwieni. Wysokociśnieniowe lampy sodowe powszechnie stosowane do oświetlania ulic odznaczają się wysoką skutecznością świetlną (od 90 $lm \cdot W^{-1}$ do 110 $lm \cdot W^{-1}$) co przewyższa prawie trzykrotnie skuteczność świetlną lamp rtęciowych. Pomiary gęstości strumieni fotonów w zakresie PAR wykazały, że w odległości 30 cm od lampy rtęciowej średnia wartość PPFD wynosi 150 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, natomiast 30 cm pod lampą sodową PPFD przekracza 450 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Zastosowanie oświetleniowych lamp sodowych do produkcji roślinnej jest jednak ograniczone ze względu na zbyt mały udział w ich emisji promieniowania krótkofalowego. Od kilku lat wykorzystuje się do celów ogrodniczych, a szczególnie do doświetlania rozsad pomidorów i ogórków specjalne lampy sodowe (np. SON-T Agro), które dzięki domieszkom niektórych metali ziem rzadkich emitują zwiększoną ilość energii w niebieskiej części widma.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Oddziaływanie chłodu i światła

4.1.1. Wpływ chłodu oraz chłodu i światła, a następnie fazy restytucji na fluorescencję chlorofilu w liściach dwóch odmian pomidora różniących się chłodowrażliwością

Cel badań

Celem przeprowadzonych eksperymentów było zbadanie, przy użyciu metody fluorescencyjnej wpływu chłodu oraz chłodu w połączeniu ze zwiększonym napromieniowaniem na reakcje fazy świetlnej fotosyntezy w liściach roślin dwóch odmian pomidora charakteryzujących się zróżnicowaną chłodowrażliwością. Przy użyciu tych samej metody oceniano zdolność badanych roślin do restytucji funkcji fotosyntetycznych w liściach poddanych działaniu powyższych czynników stresowych.

Materiał i metody

Rośliny pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.) odmiany gruntowej Promyk, bardziej tolerancyjnej na chłód i odmiany szklarniowej Robin – chłodowrażliwej [177], uprawiano w pojemnikach z piaskiem i podlewano pożywką Hoaglanda

(50%). Rośliny rosły w termoluminostacie TL-1 przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 150 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h), w temperaturze 24°C/18°C odpowiednio dzień/noc i wilgotności powietrza ok. 75%.

Po upływie 20 dni, gdy rośliny pomidora odm. Promyk były w fazie 1–2 liści, z najmłodszych w pełni rozwiniętych liści wycinano po trzy krążki o średnicy 11 mm, które umieszczano na powierzchni wody w oddzielnych szalkach. Jedną serię (6 sztuk) szalek oznaczoną jako **K** umieszczono w termoluminostacie, gdzie temperatura i oświetlenie zbliżone były do poprzednich warunków wzrostu (22°C; PPFD 140 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), drugą serię (**S1**) przeniesiono do innego termoluminostatu gdzie obniżono temperaturę i zmniejszono oświetlenie (4°C; PPFD 10 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), a trzecią (**S2**) do termoluminostatu, w którym warunki sprzyjały niskotemperaturowej fotoinhibicji (4°C; PPFD 800 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Po 2 godz. inkubacji, wykonano na krążkach liściowych wszystkich trzech serii pomiary wygaszania fluorescencji przy użyciu fluorymetru PAM – 200 [część 3.1.2].

Wyznaczano parametry fluorescencji chlorofilu: F_V/F_M, Y oraz Rfd. Takie same pomiary fluorescencji chlorofilu wykonano również dla pomidora odm. Robin. Uśrednione wartości parametrów z serii **K**, ich odchylenia standardowe oraz najmniejsze istotne różnice (NIR) wynikające z porównania średnich dla roślin odm. Promyk oraz odm. Robin, zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu wyznaczone dla liści pomidora odm. Promyk i odm. Robin w wariancie kontrolnym (K)

Table 1. Chlorophyll fluorescence induction parameters estimated for leaves of tomato plants cv. Promyk and cv. Robin in control variant (K)

	F_V/F_M	Y	Rfd
Promyk	0,758 ± 0,005	0,616 ± 0,021	2,11 ± 0,05
Robin	0,771 ± 0,009	0,642 ± 0,016	2,41 ± 0,11
NIR	**	*	***

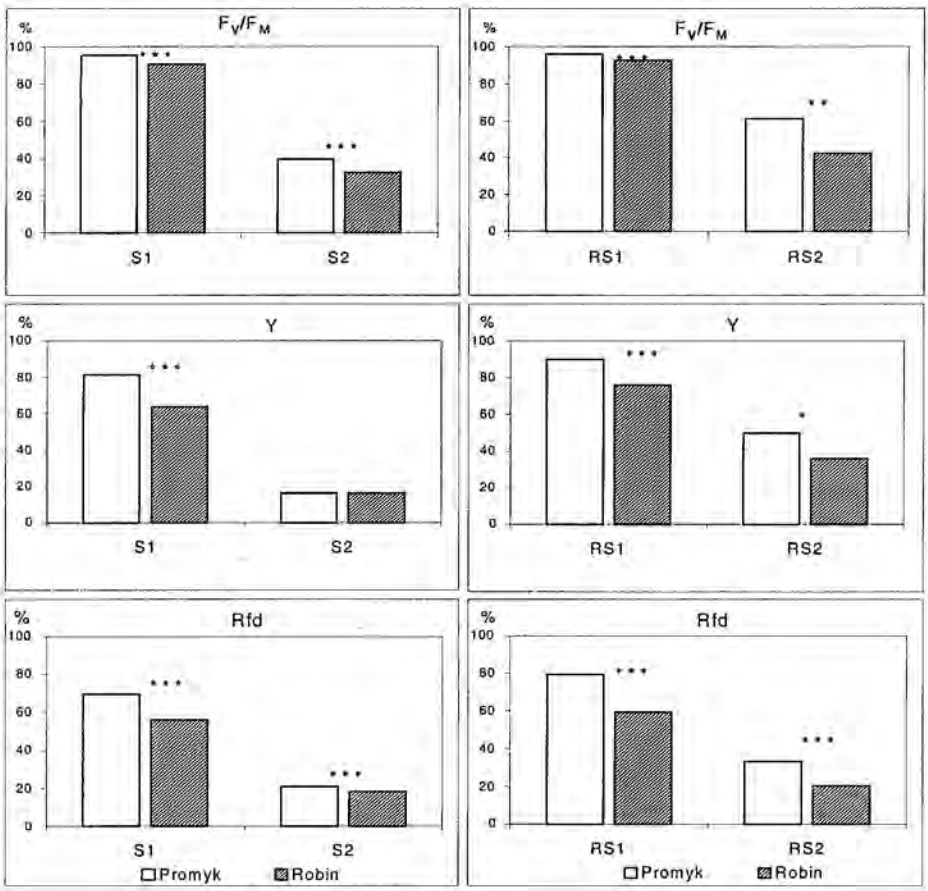
*, **, *** różnice między odmianami istotne odpowiednio na poziomie: 0,05, 0,01 i 0,001.

Następnie obliczono względne zmiany wartości wyznaczonych parametrów spowodowane działaniem czynników stresowych:

$$\mathbf{X_{S1}} \cdot 100\% / \mathbf{X_K} \text{ lub } \mathbf{X_{S2}} \cdot 100\% / \mathbf{X_K},$$

gdzie: $\mathbf{X_{S1}}$, $\mathbf{X_{S2}}$ i $\mathbf{X_K}$ to wartości danego parametru wyznaczone dla krążków liściowych należących do serii **S1, S2** i **K**.

Uśrednione dla każdej serii ilorazy (średnie arytmetyczne z 6 powtórzeń) przedstawiono w postaci diagramów oznaczając je **RS1** i **RS2** (Rys. 20). Wartości ilorazów porównano parami (odm. Promyk i Robin) stosując test t-Studenta. Różnice istotne na poziomie 0,05 oznaczono *, na poziomie 0,01 - **, a na poziomie 0,001 - ***.



Rys. 20. Względne (kontrola = 100%) obniżenie wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu w wyniku działania chłodu (**S1**) oraz chłodu i silnego światła (**S2**) na liście roślin pomidora odm. Promyk i Robin. Wartości parametrów po dobowej restytucji oznaczono jako **RS1** i **RS2**.

Fig. 20. Relative (to control = 100%) values of the parameters values of chlorophyll fluorescence induction in tomato leaves cvs. Promyk and Robin subjected to chill (**S1**) or chill and high light (**S2**) on the tomato plants cvs. Promyk and Robin. The values of the parameters after 24 hours of the restitution are marked as **RS1** and **RS2**.

Obliczone i uśrednione dla każdej serii ilorazy przedstawiają względny spadek wartości poszczególnych parametrów FL chlorofilu pod wpływem chłodu oraz chłodu i silnego światła. Przedstawiono je w postaci diagramów oznaczając odp.: **S1** i **S2** (Rys. 20). Po pomiarach, próbki liściowe serii **S1** i **S2** odkładano ponownie do szalek z wodą, które umieszczano w wyciemnionym termostacie (22°C) w celu restytucji powstałych uszkodzeń lub zakłóconych funkcji aparatu fotosyntetycznego. Do tego samego termostatu odłożono także próbki serii **K**. Po jednodobowej restytucji powtórzono pomiary i obliczono względne zmiany wartości tych samych co poprzednio parametrów:

$$X_{RS1} \cdot 100\% / X_{RK} \text{ lub } X_{RS2} \cdot 100\% / X_{RK},$$

gdzie: X_{RS1}, X_{RS2} i X_{RK} to wartości danego parametru wyznaczone po jednodobowej restytucji, odpowiednio dla krążków z serii: **S1, S2** i **K**.

Dyskusja wyników

Z porównania wartości wyznaczonych parametrów fluorescencji dla liści badanych odmian pomidora nie poddanych czynnikom stresowym (wariant K) wynika, że rośliny odm. Robin wykazują potencjalnie wyższą od roślin odm. Promyk, zdolność do efektywnej fotosyntezy (Tabela 1), co daje podstawy do prognozowania ich wyższej produktywności w optymalnych warunkach np. w uprawach szklarniowych.

Pod wpływem chłodu (wariant **S1**) nastąpił znaczny spadek wartości wszystkich parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach obu odmian, jednak rośliny odm. Promyk okazały się na tyle bardziej tolerancyjne, że we wszystkich przypadkach względne obniżenie parametrów dla liści tej odmiany było mniejsze niż dla liści należących do odm. Robin (Rys. 20).

Wydajność przemiany energii świetlnej w PS II (Y) obniżyła się względem kontroli u odm. Promyk o ok. 18% podczas gdy w liściach odm. Robin o ponad 35%. Również duże zróżnicowanie można stwierdzić porównując wartości Rfd (wskaźnika potencjalnej zdolności chloroplastów do fotosyntezy). Pod wpływem niskiej temperatury wartość Rfd zmniejszyła się o ok. 30% w liściach pomidora odm. Promyk, natomiast w liściach odm. Robin zmalała aż o 44%. Godnym uwagi jest niezbyt duży, bo tylko kilkuprocentowy spadek wartości F_V/F_M u obu odmian, co może świadczyć, że centrum reakcji fotochemicznej PS II nie jest głównym miejscem uszkodzeń chłodowych.

Jednoczesne oddziaływanie chłodu i silnego światła jest dużo bardziej szkodliwe dla roślin chłodowrażliwych ponieważ w efekcie takiego oddziaływania dość często następuje niskotemperaturowa fotoinhibicja procesu fotosyntezy.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że w warunkach działania dwóch czynników stresowych zarówno maksymalna efektywność reakcji fotochemicznej w PS II (parametr F_V/F_M) jak i wskaźnik witalności (parametru Rfd) u roślin odm. Promyk są istotnie wyższe od odpowiednich parametrów wyznaczonych dla roślin odmiany Robin (Rys. 20; **S2**). Zmniejszenie wydajności reakcji fazy świetlnej (Y) o ponad 80% w liściach obu odmian świadczy, że w warunkach podwójnego stresu (**S2**) nastąpiło znacznie poważniejsze niż w warunkach samego chłodu (**S1**), zakłócenie procesu fotosyntezy, co jest zgodne z wynikami innych prac [18,170].

Po jednodobowym okresie restytucji w tkankach liści pomidora odm. Promyk, które poddano działaniu jedynie chłodu (**RS1**), w znacznym stopniu przywrócone zostały funkcje fotosyntetyczne (Rys. 20; **RS1**). W liściach odm. Robin nastąpiła również poprawa efektywności reakcji fotochemicznej oraz wydajności kwantowej PS II (wzrost wartości F_V/F_M oraz Y) jednak wartość Rfd nie przekroczył 60% wartości w kontroli. Restytucja uszkodzeń fotoinhibicyjnych (**RS2**) była znacznie mniej skuteczna, co może świadczyć o poważnej i nieodwracalnej dysfunkcji procesu fotosyntezy, chociaż i w tym przypadku rośliny odm. Promyk poprawiały swoje parametry w stopniu wyższym niż rośliny odm. Robin. Na stosunkowo niskim poziomie pozostała potencjalna zdolność chloroplastów do przeprowadzania procesu fotosyntezy o czym można wnioskować z niewielkiego wzrostu (u obu odmian) wskaźnika Rfd. Może to świadczyć o daleko idącej inhibicji reakcji enzymatycznych w fazie ciemnej fotosyntezy [100].

Wnioski

A. Wartości parametrów FL chlorofilu w liściach pomidora wyznaczone dla wariantu kontrolnego („bezstresowego") wskazują, że efektywność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w roślinach odm. szklarniowej Robin jest wyższa w porównaniu z efektywnością tych reakcji u odm. gruntowej Promyk.
B. Porównując zmiany wartości parametrów FL chlorofilu w liściach obu badanych odmian pomidora wywołane zastosowanymi czynnikami stresowymi wynika, że chłód połączony ze zwiększonym napromieniowaniem PAR wywołuje znacznie poważniejsze zakłócenia w przebiegu reakcji fazy świetlnej fotosyntezy niż taki sam chłód bez światła.
C. Z przeprowadzonych pomiarów FL chlorofilu można wnioskować, że rośliny odm. Promyk wykazują wyższą tolerancję na chłód połączony ze światłem oraz dużo wyższą tolerancję na chłód bez światła w porównaniu z roślinami pomidora odm. Robin.

D. Po jednodobowej restytucji nastąpił znaczny wzrost wartości wyznaczanych parametrów FL chlorofilu w liściach odm. Promyk, co może świadczyć o zdolności roślin tej odmiany do skutecznej naprawy uszkodzeń chłodowych oraz efektów fotoinhibicyjnych, natomiast w przypadku roślin odm. Robin zwiększenie tych wartości było niewielkie co wskazuje na prawdopodobnie nieodwracalny charakter uszkodzeń struktury i funkcji aparatu fotosyntetycznego.

4.1.2. Wpływ chłodu i światła na fluorescencję chlorofilu w liściach dwóch odmian ogórka o zróżnicowanej chłodowrażliwości

Cel badań

Celem przeprowadzonych badań była ocena jednoczesnego oddziaływania niskiej temperatury i silnego światła na rośliny ogórka należące do dwóch odmian różniących się chłodowrażliwością.

Materiał i metody

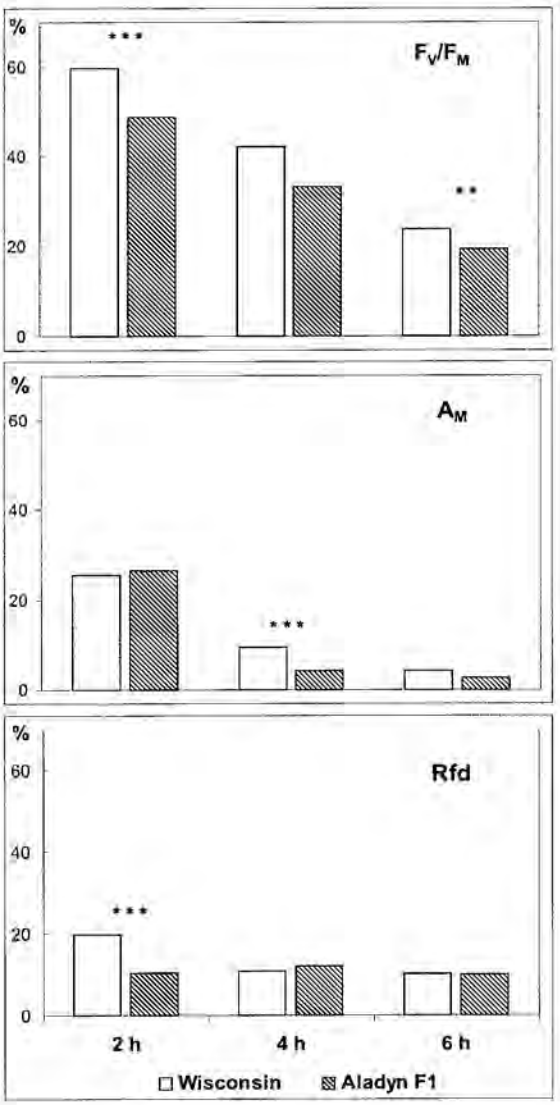
Rośliny ogórka odmiany Aladyn F1 (chłodowrażliwa) i Wisconsin (tolerancyjna na chłód) uprawiano w pojemnikach z piaskiem i podlewano pożywką Hoaglanda (50%). Rośliny rosły w termoluminostacie TL-1 przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 150 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h), w temperaturze 22°C/18°C, odpowiednio dzień/noc i wilgotności powietrza ok. 75%. Po upływie 20 dni, z drugich liści 6 roślin wycięto po dwa krążki o średnicy 11 mm (jeden do serii **K**, drugi do serii **S**), które umieszczono na powierzchni wody destylowanej w oddzielnych szalkach.

Tabela 2. Wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu wyznaczone dla liści ogórka odm. Wisconsin i odm. Aladyn F1 w wariancie kontrolnym (K)

Table 2. Chlorophyll fluorescence induction parameters estimated for leaves of cucumber plants cv. Wisconsin and cv. Aladyn F1 in control variant (K)

	F_V/F_M	A_M	Rfd
Wisconsin	0,793 ± 0,016	17,9 ± 0,7	2,70 ± 0,34
Aladyn F1	0,795 ± 0,012	18,0 ± 1,7	3,07 ± 0,22
NIR	b.r.	b.r.	***

*** różnica między odmianami istotna na poziomie istotności 0,001, b.r. - brak różnicy na poziomie istotności 0,05.



Rys. 21. Względne (kontrola = 100%) wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu w liściach ogórka odm. Aladyn F1 i Wisconsin po 2, 4 i 6 godzinach jednoczesnego oddziaływania chłodu i światła.

Fig. 21. Relative (to control = 100%) value of the parameters of chlorophyll fluorescence induction in cucumber leaves cvs. Aladyn F1 and Wisconsin after 2, 4 and 6 hours of simultaneous action of chill and light.

Jedną serię – **K** (6 sztuk) umieszczono w dotychczasowych warunkach wzrostu roślin natomiast drugą serię – **S**, przeniesiono do termoluminostatu, w którym temperaturę obniżono do 4°C, a poziom PPFD zwiększono do 700 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Po 2, 4, i 6 godzinach na krążkach serii **K** oraz serii poddanej czynnikom stresowym (**S**) wyznaczono parametry IFL chlorofilu: F_V/F_M, A_M oraz Rfd (Rys. 21).

Z otrzymanych wyników pomiarów indukcji fluorescencji chlorofilu można wnioskować, że badane odmiany ogórka różnią się wrażliwością na jednoczesne oddziaływanie obniżonej temperatury i światła (Rys. 21). Rośliny należące do tradycyjnej odm. Wisconsin lepiej niż rośliny mieszańca Aladyn F1 przetrwały dwugodzinne oddziaływanie niskiej temperatury (4°C) i pięciokrotnie zwiększonego promieniowania PAR (PPFD 700 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Przedłużenie działania obu czynników stresowych spowodowało stopniowe zmniejszanie wartości F_V/F_M (w obu genotypach ogórka) co wskazuje na pogłębiającą się dysfunkcję reakcji fotochemicznej w PS II, jednak nie jest ona tak drastyczna jak obniżanie się wartości Rfd. Uzyskane wyniki wskazują, że niskotemperaturowa inaktywacja reakcji enzymatycznych fazy ciemnej może być jedną z głównych przyczyn znacznego spadku efektywności procesu fotosyntezy.

Gruntowe odmiany ogórka są wysadzane na plantacjach w pierwszych dniach maja, kiedy niejednokrotnie porannym chłodom towarzyszy dosyć silne nasłonecznienie. W takich warunkach nawet kilkugodzinna ekspozycja młodych roślin ogórka na stres chłodowy może negatywnie zaważyć na ich dalszym wzroście i rozwoju.

Wnioski

A. Z przeprowadzonych pomiarów luminescencyjnych można wnioskować, że w zastosowanych warunkach chłodu i zwiększonego napromieniowania PAR, efektywność reakcji fotochemicznej w PS II i potencjalna zdolność do fotosyntezy w liściach roślin ogórka odm. Aladyn F1 były ogólnie niższe od takich samych cech wyznaczonych dla roślin ogórka odm. Wisconsin.

B. Zakłócenia reakcji fazy świetlnej fotosyntezy pod wpływem zastosowanych czynników stresowych były w dużej mierze uwarunkowane czasem oddziaływania i już po 4 godzinach, jednoczesnego działania niskiej temperatury i światła na liście obu badanych odmian ogórka, nastąpił prawie całkowity zanik ich potencjalnej zdolności do fotosyntezy.

4.2. Oddziaływanie wysokiej temperatury

4.2.1. Wpływ wysokiej temperatury na przebieg indukcji fluorescencji chlorofilu w roślinach dwóch odmian pomidora różniących się termowrażliwością

Cel badań

Celem przeprowadzonych eksperymentów było zbadanie przy użyciu metody fluorescencyjnej, zmian efektywność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w roślinach należących do dwóch zróżnicowanych odmian pomidora poddanych działaniu podwyższonej temperatury.

Materiał i metody

Rośliny pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.) odmiany Robin i Roma rosły w termoluminostacie TL-1 na podłożu piaskowym, przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 160 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 14 h), w temperaturze 24°C/18°C odpowiednio dzień/noc i wilgotności powietrza ok. 70%. Rośliny podlewano pożywką Hoaglanda (50%). Odmiana Robin należy do tolerancyjnej na przegrzanie natomiast rośliny odm. Roma posiadają opinię termowrażliwych. Po upływie 25 dni, gdy rośliny były w fazie 3–4 liści, z najmłodszych w pełni rozwiniętych liści wycięto krążki o średnicy 11 mm.

Krążki nakrywano płytką ze szkła organicznego i umieszczano na powierzchni termostatowanego stolika (25°C). Stolik z krążkiem wprowadzano do fluorymetru i po 20-minutowej adaptacji w ciemności rejestrowano przez 4 minuty krzywą indukcji fluorescencji chlorofilu.

Po wykonanym pomiarze (etap I), następowało stopniowe ogrzewanie badanej próbki (pozostającej cały czas w wyciemnionej kamerze) z prędkością 0,5°C/15 s, do temperatury 38°C. Po upływie 10-minutowej adaptacji próbki w temperaturze 38°C, wykonywano powtórny pomiar indukcji fluorescencji chlorofilu (etap II). W obu etapach wyznaczano następujące parametry: F_V/F_P, A_M i Rfd. Wyniki uzyskane w I etapie (w temp. 25°C) przedstawiono w Tabeli 3 jako średnie arytmetyczne z sześciu powtórzeń.

Diagramy przedstawiają względne wartości (kontrola 100%) poszczególnych parametrów FL chlorofilu w podwyższonej temperatury (Rys. 22). Uśrednione wartości serii pomiarów danego parametru wyznaczone dla obu odmian, porównywano ze sobą za pomocą testu t-Studenta. Różnice istotne na poziomie 0,001 oznaczono (***), b.r. – brak różnicy przy poziomie istotności 0,05.

Dyskusja wyników

Wyznaczone w temperaturze 25°C wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu nie różniły się między sobą w stopniu istotnym, co świadczy o zbliżonej efektywności reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w liściach obu badanych odmian pomidora (Tabela 3).

W roślinach należących do termowrażliwej odmiany Roma wartości wyznaczonych parametrów obniżyły się pod wpływem podwyższonej temperatury dużo bardziej niż w roślinach odmiany Robin. Zmiany te dotyczą zwłaszcza wielkości puli niezredukowanych akceptorów elektronów w PS II (A_M zmniejszyła się o ok. 93%) oraz aktywności fotochemicznej PS II (wartość F_V/F_P zmniejszyła się o ok. 81%), podczas gdy w liściach odmiany Robin wartości obu tych parametrów obniżyły się odpowiednio o ok. 64% i o 50% (Rys. 22).

Tabela 3. Parametry indukcji fluorescencji chlorofilu w liściach pomidora odm. Robin I odm. Roma wyznaczone w temperaturze 25°C

Table 3. Chlorophyll fluorescence induction parameters of cv. Robin and cv. Roma estimated at 25°C

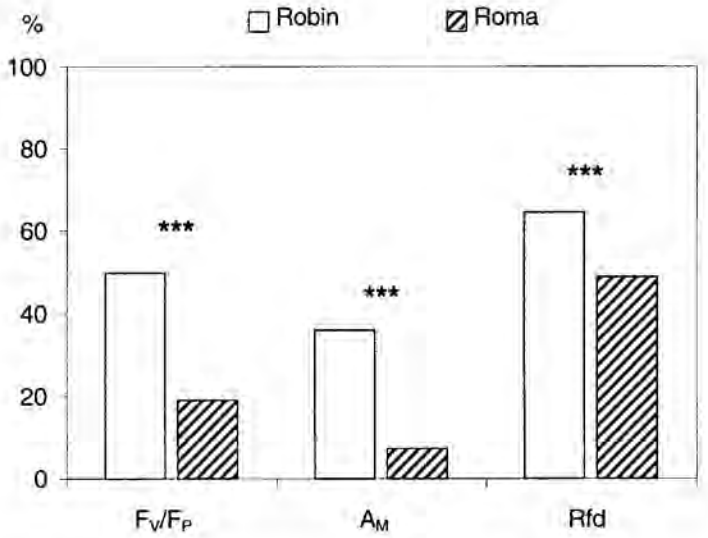
Odmiana	F_V/F_P	A_M	Rfd
Robin	0,753 ± 0,017	55,5 ± 4,9	2,64 ± 0,11
Roma	0,750 ± 0,025	54,6 ± 5,7	2,46 ± 0,17
	b.r.	b.r.	b.r.

b r. - brak różnicy między odmianami na poziomie istotności 0,05.

Termoindukowana inhibicja reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w roślinach odm. Roma ma przypuszczalnie związek z destrukcją ultrastruktury tylakoidów. Efekt taki zarejestrowano przy użyciu mikroskopu elektronowego w liściach roślin tej samej odmiany po kilkunastodniowej ich inkubacji w temperaturze (38°C /25°C; odp. dzień/ noc) [173].

Podwyższona temperatura najmniej wpłynęła na zmianę wartości wskaźnika witalności Rfd, gdyż dla odmiany Roma wartość tego wskaźnika obniżyła się o ok. 51%, a dla odmiany Robin tylko o ok. 36%. Fakt ten można tłumaczyć względnie wysoką termoodpornością enzymów biorących udział w reakcjach fazy ciemnej fotosyntezy [153].

Niskie wartości parametrów IFL chlorofilu w roślinach odm. Roma poddanych działaniu podwyższonej temperatury świadczące o termowrażliwości tej odmiany pomidora znalazły potwierdzenie także i w innych pracach [175,176].



Rys. 22. Względne (kontrola = 100%) obniżenie wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu w wyniku działania podwyższonej temperatury (38°C) na liście pomidora odm. Robin i Roma. Szczegóły w tekście.

Fig. 22. Relative (to control = 100%) decrease in the values of some parameters of chlorophyll fluorescence induction in tomato leaves cvs. Robin and Roma. Details in text.

Wnioski

A. Wartości głównych parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu w liściach obu odmian pomidora (wyznaczone w warunkach „bezstresowych") są zbliżone, co świadczy o podobnej potencjalnej aktywności fotosyntetycznej roślin należących do odmian Robin i Roma.

B. Podwyższenie temperatury liści roślin odmiany Robin do 38°C spowodowało dość duże, ale zróżnicowane obniżenie wartości wyznaczanych parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu wskazujące na dość znaczny spadek efektywności fazy świetlnej fotosyntezy, a w mniejszym stopniu na pogorszenie wskaźnika witalności.

C. Zastosowane warunki stresowe (38°C w czasie 10 min.) spowodowały znaczne zmniejszenie wartości wyznaczonych parametrów fluorescencyjnych w liściach pomidora odm. Roma świadczące o prawie całkowitej inhibicji reakcji fazy świetlnej fotosyntezy i jest to prawdopodobną przyczyną wysokiej termowrażliwości tej odmiany.

4.2.2. Wpływ hartowania na podwyższenie termoodporności roślin dwóch odmian pomidora

Cel badań

Celem badań było opracowanie metody oceny efektywności reakcji pierwotnych fotosyntezy oraz kontroli procesu hartowania roślin (na wysoką temperaturę) przy wykorzystaniu fluorescencji chlorofilu.

Materiał i metody

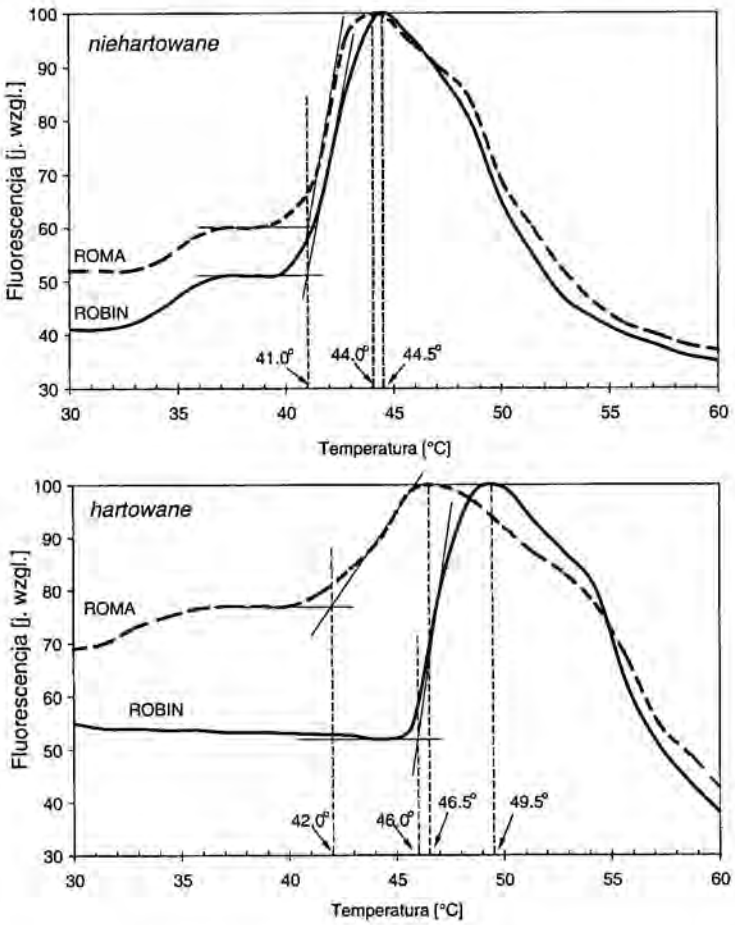
Rośliny pomidora odmiany Robin (tolerancyjnej na przegrzanie) i Roma (odm. wrażliwa) rosły w termoluminostacie TL-1 na podłożu piaskowym, przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 160 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 14 h, w temperaturze 24°C/18°C odpowiednio dzień/noc i wilgotności powietrza ok. 70%. Rośliny podlewano pożywką Hoaglanda (50%).

Po upływie 25 dni, gdy rośliny były w fazie 3–4 liści zostały podzielone na dwie grupy. W każdej grupie było 6 roślin odmiany Robin i 6 roślin odmiany Roma. Rośliny z I grupy pozostały w dotychczasowych warunkach wzrostu (kontrola), a rośliny II grupy zostały przeniesione do termoluminostatu, w którym stopniowo (1°C/8 min.) podniesiono temperaturę od 25°C do 38°C. Warunki świetlne oraz wilgotność w obu termoluminostatach pozostawały niezmienione. Rośliny II grupy przez 3 doby poddane były działaniu temperatury hartującej 38°C w dzień i 30°C w nocy. Na skutek transpiracji temperatura liści była ok. 2°C niższa od temperatury otaczającego powietrza. Po upływie 3 dni, z najmłodszych w pełni rozwiniętych liści (z roślin kontrolnych i hartowanych) wycięto krążki o średnicy 11 mm. Krążki liściowe nakrywano płytką ze szkła organicznego i umieszczano na powierzchni termostatowanego stolika (30°C), który wprowadzano do fluorymetru i rejestrowano zmiany wydajności fluorescencji zerowej (F_0) podczas wzrostu temperatury (1°C/20 s) od 30°C do 70°C. Uśrednione przebiegi termogramów FL zamieszczono na Rys. 23.

Dyskusja wyników

Analiza termogramów fluorescencji zerowej dostarcza cennych informacji o efektywności reakcji fazy świetlnej fotosyntezy na jej etapie fotofizycznym [część 2.1] oraz stabilności kompleksów barwnikowo-białkowych („anten" barwnikowych) w podwyższonej temperaturze [62,145,162]. Temperaturę progową (T_P) wyznaczoną z termogramów można uznać za maksymalną temperaturę, w której proces fotosyntezy nie ulega jeszcze inhibicji [część 3.1.3]. Z przebiegu

uśrednionych termogramów (Rys. 23; górny) wynika, że termowrażliwość niezahartowanych roślin obu badanych odmian pomidora jest zbliżona. Po 3 dobach hartowania w podwyższonej temperaturze przebiegi obu termogramów uległy znacznemu zróżnicowaniu (Rys. 23; dolny). W liściach pomidora odm. Roma poziom F_0 (rejestrowany w temperaturze zbliżonej do optymalnej tzn. ok. 30°C) jest



Rys. 23. Termogramy fluorescencji liści pomidora (Robin – odm. tolerancyjna, Roma – odm. wrażliwa na wysoką temperaturę). Liście ogrzewano z szybkością 1°C na 20s. Szczegóły w tekście.

Fig. 23. Thermograms of chlorophyll fluorescence in tomato leaves (Robin – tolerant, Roma – sensitive to heat). Leaf were heated up at the rate 1°C per 20s. Details in the text.

wyższy niż u odm. Robin. Może to świadczyć o mniejszej sprawności przekazywania energii wzbudzenia pomiędzy cząsteczkami barwników w antenie energetycznej PS II. Utrudniona migracja energii wzbudzenia w antenie energetycznej zwiększa prawdopodobieństwo jej dezaktywacji na drodze promienistej, czego mierzalnym efektem jest wzrost natężenia F_0. W wyniku hartowania roślin odm. Roma nieznacznie wzrosła wartość T_P oraz w niewielkim stopniu wzrosła temperatura maksymalna T_M. Inny obraz przedstawia termogram roślin pomidora odm. Robin po ich zahartowaniu. Zwraca tu uwagę wzrost temperatury T_P o ok. 4°C oraz podobny przyrost wartości T_M, co świadczy o zdecydowanym podwyższeniu termostabilności kompleksu PS II, a szczególnie jego barwnikowo-białkowych struktur „antenowych" [12,93,185].

Wnioski

A. Z porównania termogramów fluorescencji zerowej wynika, że rośliny pomidora należące do badanych odmian Robin i Roma podczas podwyższania temperatury liści wykazują podobną stabilność struktur barwnikowo-białkowych w aparacie fotosyntetycznym.
B. Pod wpływem 3 dniowego hartowania temperatura progowa w liściach pomidora odm. Robin wzrosła o ok. 4°C, natomiast rośliny odm. Roma nie podwyższyły termostabilności swoich struktur barwnikowo-białkowych co może być jedną z ważniejszych przyczyn wrażliwości roślin tej odmiany na przegrzanie.

4.2.3. Wpływ mutacji genetycznej w roślinach rzepaku na wzrost ich termowrażliwości i zmiany wydajności luminescencji chlorofilu

Cel badań

Celem przeprowadzonych badań była możliwość zastosowania metod luminescencyjnych do oceny efektywności reakcji w fazie świetlnej fotosyntezy oraz określania termowrażliwości roślin rzepaku triazynoodpornego i porównania tych cech z analogicznymi cechami wyznaczonymi dla roślin rzepaku posiadającego prawidłowy genotyp.

Materiał i metody

Rośliny rzepaku (*Brassica napus* L.) odmiany Marita oraz triazynoodpornego rodu 7841/1i/95[1] rosły w termoluminostacie TL-1 na podłożu piaskowym podlewane pożywką Hoaglanda (50%), przy oświetleniu lampami LRFR 400

(PPFD 160 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h), w temperaturze 18°C/15°C odpowiednio dzień/noc i wilgotności powietrza ok. 70%. Do badań pobierano krążki o średnicy 13 mm, wycięte z liścieni roślin 8-dniowych oraz z liści roślin 18-dniowych. Wyznaczano parametry IFL chlorofilu (F_0, F_V/F_P, A_M, Rfd) oraz szybkość zaniku OL chlorofilu (L_D). Pomiary IFL wykonano przy użyciu fluorymetru [część 3.1.1], a OL przy użyciu wysokoczułego luminometru [część 3.1.5].

Termogramy F_0 w zakresie od 30°C do 70°C zarejestrowano przy użyciu uniwersalnego zestawu pomiarowego [część 3.1.3], a na ich podstawie wyznaczono uśrednione wartości T_P. Wyniki wszystkich pomiarów przedstawiono jako średnie arytmetyczne z 6 powtórzeń. Uśrednione wartości tych samych parametrów obu genotypów porównano ze sobą za pomocą testu t-Studenta. Różnice istotne na poziomie 0,05 oznaczono gwiazdką (*).

Tabela 4. Wartości parametrów luminescencji chlorofilu wyznaczone dla liści rzepaku odm. Marita oraz triazynoodpornego rodu 7841/1i/99

Table 4. Chlorophyll luminescence parameters for oilseed rape leaves of cv. Marita and triazine-resistant line 7841/1i/99

	F_0	F_V/F_P	A_M	Rfd	L_D
Marita	233	0,787	14,5	2,11	281
7841/1i/95	306	0,700	15,5	1,31	19
$NIR_{0,05}$	***	***	b. r.	***	***

*** różnica między genotypami istotna na poziomie 0,001; b.r. – brak różnicy.

Dyskusja wyników

Pobierane do badań rośliny rzepaku ozimego odmiany Marita i triazynoodpornego rodu nie różniły się morfologicznie, a ich rozwój i tempo wzrostu były zbliżone. Z pomiaru indukcji fluorescencji chlorofilu wynika że, w roślinach rzepaku triazynoodpornego (posiadającego zamienione niektóre aminokwasy w białku D1 wskutek mutacji genu *psb* A kodującego to białko) zakłócone są reakcje fazy świetlnej fotosyntezy (Tabela 4). Niższa wartość parametru F_V/F_P informuje o mniejszej sprawności reakcji fotochemicznej, z czym wiąże się niższa efektywność transportu elektronów w PS II [61,193]. W liściach roślin posiadających zmieniony genom chloroplastowy można także stwierdzić większe straty energii wzbudzenia podczas ich migracji w antenach barwnikowych, ponieważ wartość FL chlorofilu F_0 jest wyższa o ok. 30% w porównaniu z roślinami odm Marita. Dość znaczne

zmniejszenie wskaźnika witalności Rfd (o ok. 38%) jest prawdopodobnie w tym przypadku spowodowane zmniejszoną aktywnością reakcji fazy świetlnej fotosyntezy.

Przeprowadzone pomiary OL chlorofilu na krążkach z liści obu badanych genotypów rzepaku dostarczyły nowych cennych informacji. Wartość wyznaczonego parametru L_D (Tabela 4) dla liści triazynoodpornego rodu jest ok. 15 krotnie niższa od wartości L_D wyznaczonego dla liści odm. Marita. Parametr L_D jest bardzo czułym wskaźnikiem szybkości przekazywania elektronu od pierwotnego stabilnego akceptora chinonowego PQ_A na wtórny akceptor chinonowy PQ_B, który jest związany z białkiem D1 w kompleksie PS II [118,121,134]. Niska wartość tego parametru wskazuje, że zmodyfikowane białko D1 w znacznym stopniu utrudnia przekazywanie elektronu z PQ_A na PQ_B, będąc pierwotną i główną przyczyną zmniejszenia efektywności fazy świetlnej fotosyntezy, co potwierdzają obniżone wartości wyznaczonych parametrów IFL.

Z porównania temperatur progowych T_P [°C] wyznaczonych z termogramów tkanek asymilacyjnych (Tabela 5) obu badanych genotypów rzepaku wynika, że rośliny triazynoodporne charakteryzują się większą termowrażliwością.

Tabela 5. Wartości temperatury progowej (T_P [°C]) wyznaczone z termogramów liści rzepaku odmiany Marita i triazynoodpornego rodu 7841/1i/95

Table 5. Critical temperature values (T_P [°C]) derived from thermograms of winter oilseed rape of cv. Marit and triazine-resistant line 7841/1i/95

Genotyp	Liścienie	Liście
Marita	48,2	48,5
7841/1i/95	46,2	44,5
$NIR_{0,05}$	*	*

* różnica między genotypami istotna na poziomie 0,05.

Wnioski

A. Z otrzymanych parametrów luminescencji chlorofilu w liściach obu badanych genotypów wynika, że rośliny rzepaku triazynoodpornego charakteryzuje obniżona efektywność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy, a szczególnie spowolniony transport elektronów w PS II w porównaniu z tymi samymi cechami wyznaczonymi dla roślin rzepaku odmiany Marita.

B. Temperatury progowe odczytane z termogramów fluorescencji zerowej wskazują, że struktury białkowo-barwnikowe w antenach energetycznych zarówno liścieni, jak i liści rzepaku triazynoodpornego są bardziej wrażliwe na wysoką temperaturę niż analogiczne struktury w roślinach rzepaku odm. Marita.

4.3. Deficyt wody

4.3.1. Wpływ odwodnienia na opóźnioną luminescencję chlorofilu w liściach pszenicy i jęczmienia

Cel badań

Celem pracy było opracowanie luminescencyjnej metody badania wrażliwości roślin zbożowych na dehydratację ich tkanek oraz sprawdzenie, czy miarą tej wrażliwości może być efektywność transportu elektronów w II fotosystemie określana na drodze detekcji OL chlorofilu.

Materiał i metody

Badano rośliny dwóch odmian pszenicy (*Triticum aestivum* L.) o zróżnicowanej wrażliwości na suszę: Odesska 51 (tolerancyjna) i Bezostna 1 (wrażliwa) oraz dwóch odmian jęczmienia: Gryf (tolerancyjna) i Aramir (wrażliwa). Rośliny rosły w TL-1, w kulturze piaskowej, podlewane pożywką Hoaglanda (50%). Oświetlenie lampami LRFR 400 (PPFD 200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h), temperatura 15°C/12°C (dzień/noc) i wilgotność powietrza ok. 70%. Po 20 dniach wzrostu wykonano pomiary OL na liściach pszenicy, a po 14 dniach – na liściach jęczmienia.

Ze środkowych części drugiego liścia obu porównywanych odmian pszenicy wycinano 4 centymetrowe fragmenty, każdy dzielono na dwie jednakowe części i ważono. Następnie jedną część umieszczano w zamkniętej szalce na wilgotnej bibule jako kontrolną (K), natomiast drugą część blaszki liściowej (B) o takiej samej masie jak K, umieszczano w otwartej szalce na suchej bibule w celu suszenia. Każda z serii (K i B) zawierała 6 prób. Wszystkie szalki z próbkami serii K i B umieszczano na 4 godziny w termostacie w temperaturze 30°C. Po upływie 4 h próbki ważono i obliczano ubytek wyparowanej wody. W seriach kontrolnych nie stwierdzono ubytku masy (na poziomie istotności 0,95), natomiast w obu seriach poddanych suszeniu (B) ubytek ten wynosił 62% ± 3% początkowej masy fragmentów liści.

Następnie mierzono wartości OL chlorofilu wszystkich próbek [część 3.1.5]. Dla każdego fragmentu liścia z serii B obliczano względną wartość [N_D(B)] po suszeniu:

$$[N_D(B)] = N_D(B) \cdot 100\%/N_D(K),$$

gdzie: N_D(B) i N_D(K) to wartości składowych dekasekundowych OL chlorofilu zmierzone odpowiednio dla próbki suszonej i dla próbki kontrolnej.

W Tabeli 6 zamieszczono uśrednione wartości [N_D(B)] obliczone dla liści pszenicy odm. Odesska 51 (tolerancyjnej) oraz dla liści pszenicy odm. Bezostna 1 (wrażliwej na suszę).

Ze środkowych części drugich liści obu porównywanych odmian jęczmienia wycinano fragmenty (ok. 4 cm) i każdy dzielono na dwie jednakowe części. Jedną część, traktowaną jako kontrolną (K), umieszczano na powierzchni wody destylowanej, a drugą część na powierzchni 1,5 molowego roztworu sacharozy. Obie serie próbek: K i B (po 6 sztuk każda) umieszczano na 3 godziny w termostacie w temperaturze 30°C. Po tym czasie mierzono wartości OL chlorofilu dla obu serii próbek [część 3.1.5].

Tabela 6. Wartości [N_D(B)] określające względne zmniejszenie natężenia opóźnionej luminescencji chlorofilu w liściach pszenicy poddanych powietrznemu suszeniu

Table 6. Values of [N_D(B)] parameter, which refers to relative value of delayed chlorophyll luminescence in air-dried leaf

Odmiana pszenicy	[N_D(B)]
Odesska 51 (tolerancyjna)	84,6% ± 4,8% [a]
Bezostna 1 (wrażliwa)	16,4% ± 3,6%

[a] odchylenia standartowe obliczono na poziomie ufności 0,95.

Dla każdego fragmentu liścia, który uległ dehydratacji na roztworze sacharozy obliczano względną wartość [N_D(B)]:

$$[N_D(B)] = N_D(B) \cdot 100\%/N_D(K),$$

gdzie: N_D(B) i N_D(K) to wartości składowych dekasekundowych OL chlorofilu [część 2.1.2.] zmierzone odpowiednio dla próbki odwodnionej na roztworze sacharozy oraz dla próbki kontrolnej.

W Tabeli 7 zamieszczono uśrednione wartości [N_D(B)] dla liści jęczmienia odm. Gryf (tolerancyjnej) oraz dla liści odm. Aramir (wrażliwej na suszę).

Tabela 7. Wartości parametru [$N_D(B)$], który określa względne zmniejszenie natężenia opóźnionej luminescencji chlorofilu w liściach jęczmienia poddanych odwodnieniu.

Table 7. Values of [$N_D(B)$] parameter, which refers to relative value of delayed chlorophyll luminescence in the dehydrated leaf

Odmiana jęczmienia	[$N_D(B)$]
Gryf (tolerancyjna)	78,8% ± 5,2% [a]
Aramir (wrażliwa)	21,4% ± 4,3%

[a] odchylenia standartowe obliczono na poziomie ufności 0,95.

Dyskusja wyników

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zmniejszenie wartości N_D jest czułym wskaźnikiem zakłócenia funkcji fotosyntetycznych w PS II spowodowanych utratą wody przez komórki miękiszu asymilacyjnego.

Na dehydratację szczególnie wrażliwy jest układ rozkładu wody zlokalizowany na stronie donorowej PS II [53,193]. Dekasekundowa składowa OL jest wynikiem dezaktywacji promienistej wzbudzonego elektronu na poziomie Q_B z ładunkiem dodatnim w układzie rozkładu wody i to tłumaczy, dlaczego pomiar wartości N_D jest czułym wskaźnikiem stresu dehydracyjnego w tkankach roślin [46,150]. Ocena odporności danego genotypu na odwodnienie przy pomocy testu luminescencyjnego jest mało czasochłonna (pomiar serii 6 próbek trwa 6 min.) i odznacza się dobrą powtarzalnością [121].

Wnioski

A. Dehydratacja tkanek liścia obniża efektywność transportu elektronów w II fotosystemie, co wpływa na zmniejszenie wartości natężenia opóźnionej luminescencji chlorofilu w jej dekasekundowym zakresie.

B. Pomiar opóźnionej luminescencji chlorofilu (w zakresie dekasekundowym) może być podstawą prostego i czułego testu wrażliwości odmian roślin uprawnych na odwodnienie.

4.3.2. Wpływ suszy oraz restytucji powstałych uszkodzeń stresowych na fluorescencję chlorofilu w liściach rzepaku

Cel badań

Celem badań była ocena zakresu oraz stopnia inhibicji reakcji fotosyntezy w liściach rzepaku poddanych znacznemu odwodnieniu, a następnie jednodobowej restytucji.

Materiał i metody

Rośliny rzepaku ozimego (*Brassica napus var. oleifera* L.) odm. Marita rosły przez 15 dni w termoluminostacie na podłożu piaskowym podlewane pożywką Hoaglanda (50%), przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 180 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h), w temperaturze 18°C/15°C, odpowiednio dzień/noc i wilgotności powietrza ok. 70%. Do badań pobierano krążki o średnicy 9 mm wycinane z środkowej części pierwszych liści. W każdej serii było 8 krążków wyciętych z liści należących do 8 roślin. Krążki przed pomiarami inkubowano przez 4 godziny, przy umiarkowanym świetle (PPFD 100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) na powierzchni wody. Pomiary FL chlorofilu wykonywano przy użyciu fluorymetru PAM 200, wyznaczając parametry: F_0, F_V/F_M, Rfd, qP i Y [część 3.1.2]. Utratę wody przez liście przedstawia wskaźnik **RWC** (wyrażany w procentach stosunek aktualnej zawartości wody w tkankach do jej zawartości w tkankach, które zostały w pełni wysycone wodą).

Po wykonanych pomiarach (I cykl - kontrola) krążki liściowe były powietrznie suszone aż osiągnęły RWC około 16%, a następnie na tych samych krążkach powtórzono pomiary fluorescencyjne (II cykl - susza). Po tych pomiarach krążki poddano jednodobowej restytucji umieszczając je na powierzchni wody destylowanej (temperatura pokojowa, słabe rozproszone światło). Po 24 h krążki powtórnie ważono i po raz trzeci wykonano pomiary FL chlorofilu (III cykl - restytucja). Po okresie restytucji masy wszystkich krążków zbliżyły się do wartości początkowych (±10%).

Wszystkie pomiary wykonywano w 8 powtórzeniach, a wyniki przedstawiono w Tabeli 8 jako średnie arytmetyczne. Na podstawie analizy wariancji obliczono najmniejsze istotne różnice (NIR) za pomocą testu Tukey'a na poziomie istotności 0,05.

Tabela 8. Wartości parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach rzepaku wyznaczone przed stresem suszy (K), bezpośrednio po stresie (S) oraz po 24 godzinach restytucji (R). Objaśnienia w tekście

Table 8. Values of chlorophyll fluorescence parameters for oilseed rape leaves determined before drought stress (K), directly after drought stress (S) and after 24-hour restitution (R). Description in the text

	F_0	F_V/F_M	F_V/F_0	qP	Y	Rfd
K	188	0,768	3,33	0,872	0,623	2,380
S	267	0,527	1,14	0,121	0,067	0,157
R	219	0,560	1,82	0,731	0,380	0,822
$NIR_{0,05}$	23	0,120	0,62	0,080	0,110	0,290

Dyskusja wyników

Silne odwodnienie komórek liści w różnym stopniu naruszyło funkcje aparatu fotosyntetycznego. Wartość F_0 powiększyła się o ok. 42% (a po restytucji zbliżyła się do wartości początkowej) można więc uznać, że funkcje anteny energetycznej ucierpiały w małym stopniu, o czym świadczy niewielki wzrost fluorescencji zerowej chlorofilu. W większym stopniu uległy zakłóceniu funkcje PS II, o czym informuje dość znaczne zmniejszenie wartości F_V/F_M, a zwłaszcza spadek wartości parametru F_V/F_0 do 34% kontroli. Po jednodobowej dobowej restytucji wartości tych parametrów wzrosły jednak do 74% i ok. 50% wartości kontroli.

Pod wpływem dehydratacji zmniejszyła się znacznie zdolność aparatu fotosyntetycznego do efektywnego wygaszania stanów wzbudzonych na drodze fotochemicznej, na co wskazuje obniżona wartość qP [część 3.1.2]. Po dobie trwającej restytucji, wartość qP dość znacznie wzrosła (do 84% początkowej wartości). Znacznie zmalała wartość parametru Y (wskaźnika całkowitej wydajności kwantowej PS II) jednak w tym przypadku procesy naprawcze zdołały odtworzyć tylko 61% pełnej efektywności reakcji świetlnych w PS II. Najbardziej drastycznie obniżyła się wartość wskaźnika witalności Rfd, który nawet po dobowej restytucji osiągnął zaledwie 35% początkowej wartości. Tak znaczny i utrwalony spadek wartości Rfd świadczy o głębokiej inhibicji enzymatycznych reakcji w ciemnej fazie fotosyntezy, co znajduje potwierdzenie w pracach innych autorów, którzy badali wpływ suszy na aktywność enzymów cyklu Calvina [23,51].

Wnioski

A. Odwodnienia tkanek liści w niejednakowym stopniu oddziałuje na przebieg poszczególnych etapów procesu fotosyntezy oraz na efekty naprawcze po fazie restytucji o czym świadczą wyniki pomiarów wartości parametrów fluorescencji wykonanych przy użyciu fluorymetru PAM 200.
B. W warunkach znacznej utraty wody przez komórki mezofilu najsilniej zakłócone zostały reakcje fazy ciemnej fotosyntezy, w dalszej kolejności funkcje II fotosystemu, a najmniej wrażliwym na dehydratację okazał się etap fotofizyczny (absorpcji PAR i przekazywania energii fotowzbudzenia z anten energetycznych do centrum reakcji PS II).

4.3.3. Wpływ spermidyny na fluorescencję chlorofilu w liściach rzepaku poddanych działaniu suszy, a następnie restytucji

Cel badań

Celem podjętych prac było zbadanie wpływu egzogennie zastosowanej spermidyny na przebieg reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w liściach roślin rzepaku, które zostały w znacznym stopniu odwodnione, a następnie poddane jednodobowej restytucji.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano część dwutygodniowych roślin rzepaku ozimego odmiany Marita, które były uprawiane do celów badawczych w poprzednim eksperymencie. Ze środkowej części pierwszych liści wycięto symetrycznie po dwa krążki o średnicy 9 mm. W ten sposób otrzymano dwie serie po 8 krążków wyciętych z liści 8 roślin. Krążki jednej serii [-Spm] przed pomiarami inkubowano przy umiarkowanym świetle (PPFD 100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) przez 4 godziny na powierzchni wody, natomiast krążki drugiej serii [+Spm] inkubowano w takich samych warunkach na powierzchni 10 mM roztworu spermidyny. Pomiary fluorescencji chlorofilu wykonano przy użyciu fluorymetru PAM 200, wyznaczając parametry F_V/F_M, F_V/F_0, qP, Y i Rfd [część 3.1.2].

Po wykonanych pomiarach (I cykl, kontrola) wszystkie krążki liściowe były powietrznie suszone aż do osiągnięcia RWC ok. 16%, a następnie na tych samych krążkach powtórzono pomiary fluorescencji (II cykl, susza). Po pomiarach krążki poddano restytucji, umieszczając je na powierzchni wody destylowanej

(temperatura pokojowa, słabe rozproszone światło). Po 24 h osuszone krążki ważono i po raz trzeci wykonano pomiary ich fluorescencji (III cykl, restytucja). Po okresie restytucji masy wszystkich krążków zbliżyły się do początkowych (± 12%). Obliczono względne zmiany wartości parametrów fluorescencji krążków poddanych działaniu suszy według ogólnego wzoru:

$$X_{SUSZA} \cdot 100\% / X_{KONTROLA},$$

gdzie: X_{SUSZA} to wartość parametru otrzymanego przy pomiarze FL chlorofilu dla krążka poddanego działaniu suszy (II cykl pomiarów), a $X_{KONTROLA}$ to wartość tego parametru przed suszeniem (I cykl pomiarów).

Obliczenia wykonano dla krążków liściowych inkubowanych 4 h na wodzie [-Spm] i dla krążków pasywnie infiltrowanych przez 4 h roztworem 10 mM spermidyny [+Spm].

Podobnie obliczono względne zmiany wartości parametrów fluorescencji krążków poddanych działaniu restytucji według ogólnego wzoru:

$$X_{RESTYTUCJA} \cdot 100\% / X_{KONTROLA},$$

gdzie: $X_{RESTYTUCJA}$ to wartość parametru otrzymanego przy pomiarze FL chlorofilu dla krążka po restytucji (II pomiarów), a $X_{KONTROLA}$ to wartość tego parametru przed suszeniem (I cykl pomiarów).

Powyższe obliczenia wykonano zarówno dla krążków liściowych z pierwszego wariantu [-Spm] jak dla krążków drugiego wariantu [+Spm]. Uśrednione, względne wartości poszczególnych parametrów (z wariantu [-Spm] i [+Spm]) porównano ze sobą za pomocą testu t-Studenta. Wyniki przedstawiono w tabelach 9 i 10 jako średnie arytmetyczne z 8 powtórzeń. Różnice istotne na poziomie 0,05 oznaczono *, na poziomie 0,01 – **, a na poziomie 0,001 – ***.

Dyskusja wyników

Z porównania otrzymanych parametrów FL można wnioskować, że podobnie jak w poprzednich badaniach [część 4.3.2.] odwodnienie mezofilu liści w zróżnicowany sposób wpłynęło na przebieg głównych reakcji fotosyntezy (Tabela 9, [-Spm]). O umiarkowanym obniżeniu efektywności reakcji fotochemicznej w centrum PS II świadczy zmniejszenie wartości parametru F_V/F_M tylko o około 37%. W większym stopniu uległa obniżeniu wartość parametru F_V/F_0 (o ponad 66%) co świadczy o znacznym zakłóceniu reakcji w kompleksie rozkładu wody. W dużym stopniu obniżyła się także wartość qP, co wskazuje na znaczne zmniejszenie możliwości zużytkowania energii wzbudzenia elektronowego na drodze fotochemicznej.

Jeszcze bardziej, bo prawie o 90%, zmniejszyła się wartość parametru Y informującego o sprawności przemiany zaabsorbowanej energii fotonów na energię chemiczną. Na obniżenie sprawności tej energetycznej przemiany wpływa zarówno spadek wydajności reakcji fotochemicznej jak i straty radiacyjne przy przekazywaniu energii wzbudzenia z anten energetycznych do centrum reakcji PS II. Również wartość Rfd zmniejszyła się o ponad 93%, z czego wynika, że potencjalna gotowość chloroplastów do fotosyntezy jest w tych warunkach bardzo mała [część 2.1.2].

Tabela 9. Względne wartości parametrów fluorescencji chlorofilu wyznaczonych dla tkanek liści rzepaku poddanych stresowi suszy: bez spermidyny [-Spm] oraz z uprzednio infiltrowaną spermidyną [+Spm]
Table 9. Relative values of chlorophyll fluorescence parameters for oilseed rape leaf tissue subjected to drought stress: without spermidine [-Spm] and with previously introduced spermidine [+Spm]

$\frac{X_{SUSZA} \cdot 100\%}{X_{KONTROLA}}$	F_V/F_M	F_V/F_0	qP	Y	Rfd
[-Spm]	62,6 ± 2,1	33,5 ± 11	13,8 ± 2,6	10,7 ± 2,0	6,6 ± 0,8
[+Spm]	90,3 ± 2,6	65,4 ± 9,6	68,7 ± 7,6	58,2 ± 7,7	41,3 ± 15
NIR	***	***	***	***	***

Wprowadzenie spermidyny do tkanek liści, w znacznym stopniu poprawiło zdolność ich funkcjonowania w warunkach znacznego odwodnienia (Tabela 9; [+Spm]). Spermidyna, podobnie jak i inne poliaminy podwyższa odporność błon komórkowych roślin na działanie szeregu czynników stresowych. Chociaż spermidyna w wyższych stężeniach obniża nieco efektywność reakcji świetlnych fotosyntezy, to w opisanych warunkach stresowych sumaryczny efekt jej oddziaływania na przebieg fotosyntezy jest niewątpliwie pozytywny, o czym świadczą także wyniki poprzednich badań [46,129].

Po 24 godzinnej restytucji krążków liściowych nie infiltrowanych spermidyną (Tabela 10; [-Spm]) poprawiła się zarówno potencjalna sprawność reakcji fotochemicznej w PS II (dość wysoka wartość F_V/F_M), jak również wydajność konwersji zaabsorbowanej energii kwantów PAR w warunkach świetlnych, o czym informuje ok. pięciokrotny wzrost wartości parametru Y. Zwraca uwagę względnie niska wartość F_V/F_0 oraz wskaźnika Rfd świadczące o dużej wrażliwości, zarówno reakcji na stronie donorowej PS II jak i reakcji fazy ciemnej fotosyntezy na dehydratację komórek mezofilu.

W odwodnionych krążkach liściowych, do których wcześniej infiltrowano roztwór spermidyny efekty procesu restytucji były znacznie lepsze. Ponieważ wartości parametrów fluorescencji chlorofilu bezpośrednio związanych z reakcjami w PS II osiągnęły poziom od 84% do 95% wartości kontrolnych można uznać, że nastąpiła prawie całkowita reaktywacja funkcji II fotosystemu.

Tabela 10. Względne wartości parametrów fluorescencji chlorofilu wyznaczonych dla tkanek liści rzepaku poddanych stresowi suszy, a następnie jednodobowej restytucji: bez spermidyny [-Spm] oraz z uprzednio wprowadzoną spermidyną [+Spm]

Table 10. Relative values of chlorophyll fluorescence parameters for oilseed rape leaf tissue subjected to drought stress and left for 24-hour restitution: without spermidine [–Spm] and with previously introduced spermidine [+Spm]

$\frac{X_{RESTYTUCJA} \cdot 100\%}{X_{KONTROLA}}$	F_V/F_M	F_V/F_0	qP	Y	Rfd
[–Spm]	79,1 ± 6,7	49,6 ± 9,8	83,8 ± 7,8	60,2 ± 18	33,9 ± 8,3
[+Spm]	95,4 ± 0,7	84,0 ± 2,3	95,1 ± 3,2	86,4 ± 1,5	64,6 ± 4,4
NIR	***	***	**	*	***

Wartość wskaźnika Rfd po restytucji również uległa poprawie, jednakże pozostała o ok. 35% niższa od wartości kontrolnej (Tabela 10; [+Spm]). Świadczy to o niezrównoważeniu dość wysokiej aktywności reakcji w fazie świetlnej fotosyntezy, a możliwością wykorzystania wytworzonej siły asymilacyjnej (NADPH i ATP) w reakcjach fazy ciemnej. Można stąd wnioskować, że susza spowodowała, w dużej mierze utrwaloną inaktywację enzymów zlokalizowanych w stromie chloroplastów.

Wnioski

A. W warunkach znacznego odwodnienia liści rzepaku, w różnym stopniu uległy obniżeniu wartości parametrów fluorescencji chlorofilu (szczególnie duży spadek dotyczył wartości wskaźnika Rfd), co świadczy o zróżnicowanej wrażliwości poszczególnych etapów fotosyntezy na ten czynnik stresowy.

B. Proces restytucji w dużej mierze przywrócił początkową efektywność reakcji w fazie świetlnej fotosyntezy, natomiast w mniejszym stopniu poprawił potencjalną zdolność chloroplastów do pełnej fotosyntezy (współdziałania fazy świetlnej z fazą ciemną).

C. Dolistne zaaplikowana spermidyna znacząco podwyższyła zdolność chloroplastów do efektywnego przeprowadzania procesu fotosyntezy w odwodnionych fragmentach liści rzepaku oraz w znacznej mierze zwiększyła pozytywne efekty restytucji.

4.4. Niedobór azotu

4.4.1. Wpływ azotanu amonowego na fluorescencję i zawartość chlorofilu oraz wydajność fotosyntezy w liściach roślin kukurydzy

Cel badań

Celem wykonanej pracy było zbadanie wpływu suboptymalnych dawek azotu na wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu (związanych z efektywnością reakcji fazy świetlnej fotosyntezy), zawartość chlorofilu w liściach, natężenie fotosyntezy netto oraz niektóre wskaźniki biometryczne określające rozwój młodych roślin kukurydzy.

Materiał i metody

Doświadczenie wazonowe przeprowadzono w okresie wiosenno-letnim (maj i czerwiec) w Hali Wegetacyjnej Akademii Rolniczej w Szczecinie. Nasiona kukurydzy (*Zea mays* L.) odm. Smolimag wysiano w pojemnikach z tworzywa sztucznego zawierającego po 9 kg gleby (glina lekka z kompleksu żytniego dobrego) o wilgotności ok. 75% maksymalnej polowej wodnej, utrzymywanej przez cały czas doświadczenia. Po wykiełkowaniu roślin wykonano przerywkę, zostawiając po 10 sztuk wyrównanych siewek w każdym pojemniku. Glebę w każdym pojemniku wzbogacono przedsiewnie fosforem (0,93 g P/pojemnik, superfosfat potrójny granulowany 46%) oraz potasem (2,1 g K/pojemnik, sól potasowa 60%).

Porównywano 4 warianty nawozowe:

A. rośliny rosnące w glebie, która zawierała przedsiewnie wprowadzone dawki fosforu i potasu, ale bez dodatkowego nawożenia azotowego,
B. rośliny rosnące w glebie jak w wariancie A) + 0,3 g N/pojemnik,
C. jak w A) + 0,9 g N/pojemnik,
D. jak w A) + 2,7 g N/pojemnik.

Azot dodawano przedsiewnie w postaci roztworu azotanu amonu. Po 5 tygodniach od dnia wschodów, na 4 lub 5 liściu (pobranych z 8 roślin w każdym wariancie) wykonano pomiary zawartości chlorofilu przy użyciu miernika SPAD-502, zmierzono natężenie fotosyntezy netto przy użyciu gazoanalizatora LCA-4 [część 3.4.] i wyznaczono parametry IFL: F_V/F_M F_V/F_0 i A_M [część 3.1.1]. Powierzchnię liści zmierzono przy użyciu analizatora DIAS oraz wyznaczono suchą masę części nadziemnych roślin kukurydzy ze wszystkich wariantów nawozowych.

Wyniki przedstawiono w Tabeli 11 jako średnie arytmetyczne z 8 wykonanych powtórzeń. Na podstawie analizy wariancji obliczono najmniejsze istotne różnice między wartościami danej cechy przy poszczególnych dawkach nawozu ($NIR_{0,05}$) za pomocą testu Tukey'a na poziomie istotności 0,05.

Dyskusja wyników

Z danych w Tabeli 11 wynika, że zawartość chlorofilu w liściach kukurydzy jest w dużym zakresie uwarunkowana ilością dostarczonej dawki azotanu amonu, co potwierdza celowość zastosowania pomiarów chlorofilu *in vivo* przy użyciu mierników typu SPAD-502 do optymalizowania nawożenia azotowego przy uprawie kukurydzy oraz innych roślin uprawnych [139,142].

Dodatkowe zasilanie roślin kukurydzy azotanem amonu skutecznie wpłynęło na zwiększenie powierzchni liści oraz suchą masę części nadziemnej. Szczególnie wyraźny efekt zaobserwowano po dawce najniższej, natomiast dawka najwyższa (2,7 gN/pojem.) nie miała już istotnego wpływu na wartości obu tych cech. Można przypuszczać, że młode rośliny kukurydzy na wczesnym etapie wzrostu wegetatywnego (5 tygodni) nie miały jeszcze potrzeby pobierania i utylizacji tak dużej dawki nawozu azotowego. Natężenie fotosyntezy netto również wzrastało wraz z ilością dostępnego azotu, ale najniższa dawka (0,3 gN/pojem.) nie wywołała istotnej zmiany w wartości tego parametru.

Z analizy otrzymanych wartości parametrów IFL wynika, że wydajność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy sukcesywnie wzrasta wraz ze zwiększaniem dawek azotu, a szczególnie skuteczną okazała się dawka najwyższa (podobnie jak przy fotosyntezie netto). Dotyczy to zarówno wartości F_V/F_M i F_V/F_0 (efektywność reakcji fotochemicznej w PS II oraz rozkładu wody), jak i parametru A_M, który jest proporcjonalny do wielkości puli akceptorowej w PS II [część 2.1.2].

Tabela 11. Wpływ nawożenia azotanem amonu na zawartość chlorofilu, asymilację CO_2, powierzchnię liści, suchą masę oraz parametry fluorescencji chlorofilu w liściach kukurydzy
Table 11. Effect of ammonium nitrate on chlorophyll content, CO_2 assimilation, leaves area, dry matter and chlorophyll fluorescence induction of the maize leaves

Cecha	Dawka (gN/pojemnik)			
	0,0	0,3	0,9	2,7
Zawartość chlorofilu [SPAD]	17,8	24,5	34,8	40,8
$NIR_{0,05}$		3,22		
Fotosynteza netto [$\mu mol(CO_2) \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]	15,6	17,4	20,6	28,6
$NIR_{0,05}$		2,10		
Powierzchnia liści [cm^2/1 roślinę]	170	422	658	592
$NIR_{0,05}$		114		
Sucha masa części nadziemnej [g/1 roślinę]	0,86	1,99	2,69	2,68
$NIR_{0,05}$		0,81		
F_V/F_M	0,744	0,757	0,774	0,809
$NIR_{0,05}$		0,030		
F_V/F_0	2,92	3,15	3,43	4,24
$NIR_{0,05}$		0,47		
A_M	8,98	8,05	10,9	13,6
$NIR_{0,05}$		1,76		

Wnioski

A. Zastosowane dawki azotanu amonu pozytywnie wpłynęły na biosyntezę chlorofilu, efektywność procesu fotosyntezy (fazy świetlnej i ciemnej), a także na zwiększenie powierzchni liści oraz suchej masy badanych roślin kukurydzy.

B. W porównaniu z dawkami niższymi, najwyższa dawka azotu znacznie poprawiła wydajność fotosyntezy (istotny wzrost wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu i fotosyntezy netto), w nieco mniejszym stopniu zwiększyła zawartość chlorofilu w liściach, natomiast nie spowodowała przyrostu powierzchni liści i suchej masy badanych roślin kukurydzy.

C. Przeprowadzone badania wykazały przydatność optycznych mierników chlorofilu (np. SPAD-502) nie tylko do pomiaru zawartości tego barwnika w liściach, ale również do szybkiej i bezinwazyjnej oceny stanu odżywienia roślin w azot, co może w znacznym stopniu ułatwiać optymalizację nawożenia azotowego.

4.4.2. Porównanie nawożenia azotanem amonu i siarczanem amonu na indukcję fluorescencji chlorofilu, suchą masę oraz powierzchnię liści rzepaku

Cel badań

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu zróżnicowanych dawek azotu oraz siarki w preparatach azotanu i siarczanu amonu na wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu określających efektywność reakcji świetlnych fotosyntezy, a także oddziaływanie tych pierwiastków na zawartość chlorofilu i rozwój liści rzepaku ozimego.

Materiał i metody

Doświadczenie wazonowe przeprowadzono w Hali Wegetacyjnej Akademii Rolniczej w Szczecinie. Nasiona rzepaku ozimego (*Brassica napus var. oleifera*) odm. Marita wysiano w pojemnikach zawierającego po 6 kg gleby zaliczanej do kompleksu żytniego dobrego. Gleba (piasek gliniasty lekki) posiadała odczyn kwaśny (pH_{KCL} 4,9), zawartość próchnicy 1,2% i azotu ogólnego ok. 0,07%. W czasie doświadczenia utrzymywano wilgotność gleby ok. 70% maksymalnej polowej pojemności wodnej. Glebę w każdym pojemniku wzbogacono przedsiewnie fosforem (1,6 g P/pojemnik superfosfat potrójny 46%) oraz potasem (2,5 g K/pojemnik – sól potasowa 60%).

Porównywano oddziaływanie azotanu amonu i siarczanu amonu w 3 dawkach: 0,38, 0,75 oraz 1,5 g N/pojemnik. Oba preparaty dodawano przedsiewnie w postaci wodnych roztworów. Po wykiełkowaniu roślin wykonano dwie przerywki zostawiając po 15 sztuk wyrównanych roślin rzepaku w każdym pojemniku. Po 5 tygodniach od dnia wschodów na 3 lub 4 liściu wykonano pomiary zawartości chlorofilu przy użyciu SPAD-502 [część 3.5] i wyznaczono parametry IFL: F_V/F_M, F_V/F_0 i A_M [część 3.1.1]. Następnie zmierzono powierzchnię wszystkich liści (pobranych z 8 roślin; z 6 wariantów nawozowych) przy użyciu analizatora DIAS oraz wyznaczono ich suchą masę.

Wyniki przedstawiono w Tabeli 12 jako średnie arytmetyczne z 8 powtórzeń. Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji obliczono najmniejsze istotne różnice na poziomie istotności 0,05 ($NIR_{0,05}$) za pomocą testu Tukey'a.

Tabela 12. Wpływ azotanu amonu i siarczanu amonu na zawartość chlorofilu, powierzchnię liści, suchą masę oraz wartości parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach rzepaku

Table 12. Effect of different doses of ammonium nitrate and ammonium sulfate on chlorophyll content, leaves area, dry matter and chlorophyll fluorescence induction of oil winter rape

Cecha	Rodzaj nawozu	Dawka azotu [g N/ pojemnik]			
		0,38	0,75	1,5	Średnia
Zawartość chlorofilu [SPAD]	azotan amonu	23,4	29,9	42,6	31,9
	siarczan amonu	29,8	36,3	42,8	36,3
	średnia	26,6	33,0	42,7	34,1
	$NIR_{0,05}$	A=1,45	B=2,14	AxB=2,50	
Powierzchnia liści [cm^2/1 roślinę]	azotan amonu	23,3	52,5	161	78,8
	siarczan amonu	26,2	52,4	174	84,1
	średnia	24,8	52,5	167	81,5
	$NIR_{0,05}$	A=17,2	B=25,5	AxB=29,9	
Sucha masa liści [g/1 roślinę]	azotan amonu	172	583	1486	747
	siarczan amonu	172	615	1222	670
	średnia	172	599	1354	709
	$NIR_{0,05}$	A=152	B=224	AxB=263	
F_V/F_M	azotan amonu	0,756	0,774	0,796	0,775
	siarczan amonu	0,778	0,799	0,801	0,793
	średnia	0,767	0,787	0,799	0,784
	$NIR_{0,05}$	A=0,011	B=0,012	AxB=0,014	
F_V/F_0	azotan amonu	3,10	3,43	3,92	3,49
	siarczan amonu	3,52	3,98	4,03	3,84
	średnia	3,31	3,71	3,98	3,67
	$NIR_{0,05}$	A=0,11	B=0,16	AxB=0,19	
A_M	azotan amonu	11,8	13,4	16,4	13,8
	siarczan amonu	13,0	16,6	17,2	15,6
	średnia	12,4	15,0	16,8	14,7
	$NIR_{0,05}$	A=0,67	B=0,99	AxB=1,16	

A – zróżnicowanie reakcji na nawozy, B - zróżnicowanie reakcji na różne dawki nawozów.

Dyskusja wyników

Z danych w Tabeli 12 wynika, że azot w większych dawkach bardzo korzystnie wpływa na wzrost zarówno powierzchni liści, jak i ich całkowitej suchej masy, a rodzaj użytych nawozów amonowych nie miał istotnego znaczenia. Najwyższa zastosowana dawka azotu (1,5 g N) jest zbliżona do optymalnej, co wynika z rezultatów wcześniejszego doświadczenia [124].

Przy niższych dawkach azotu (0,38 g N i 0,75 g N) stwierdzono znaczne zmniejszenie powierzchni oraz suchej masy liści. W mniejszym stopniu znalazło to odzwierciedlenie w obniżeniu zawartości chlorofilu. Jeszcze mniejszy wpływ niskich dawek obserwowano przy porównaniu wartości odpowiednich parametrów IFL chlorofilu informujących o efektywności reakcji w fazie świetlnej fotosyntezy [część 2.1.]. Warto podkreślić, że przy dawkach: 0,38 g N i 0,75 g N zawartość chlorofilu była wyższa gdy zastosowano siarczan amonu. Znana jest ważna (chociaż nie zawsze doceniana) rola siarki w przyswajaniu azotu z gleby oraz w biosyntezie białek przez rośliny rzepaku [88,156,163]. Szczególne znaczenie ma dostępność siarki dla roślin rzepaku przy ubogim nawożeniu azotowym [156].

Analiza danych z Tabeli 12 nie tylko potwierdza kluczową rolę azotu i siarki w procesie wzrostu roślin, ale również uwidacznia ich strategię w przezwyciężaniu stresu niedoborów mineralnych. Pod szczególną ochroną znajduje się funkcjonalna sprawność aparatu fotosyntetycznego dzięki czemu nawet przy najmniejszej zastosowanej dawce 0,38 g N zawartość chlorofilu w liściach zmalała o 45%, w wariancie z azotanem amonu i tylko o 31% w wariancie z siarczanem amonu.

Jeszcze w mniejszym stopniu obniżeniu uległy wartości F_V/F_M i F_V/F_0, z czego wynika, że zarówno zdolność do konwersji energii świetlnej w PS II jak i efektywność reakcji rozkładu wody są w przypadku najmniejszej dawki niewiele niższe przy nawożeniu azotanem amonu (odp. 5% i 21%), a znikomo niższe przy nawożeniu siarczanem amonu (odp. o 3% i 12%) w porównaniu z roślinami najlepiej zaopatrzonymi w azot.

Niedobór azotu silniej wpłynął na obniżenie wartości parametru A_M, który przy najniższej dawce zmniejszył się średnio w obu wariantach nawozowych o ok. 24% (w porównaniu z dawką 1,5 g N). Przy dawce siarczanu amonu 0,75 g N wartości wyznaczonych parametrów IFL chlorofilu nie różnią się praktycznie od wartości otrzymanych przy dawce najwyższej 1,5 g N.

Wnioski

A. Zastosowanie niższych dawek azotu dostarczonych w postaci azotanu amonu w znacznym stopniu zahamowało wzrost i rozwój liści, zmniejszyło zawartość chlorofilu, ale tylko w niewielkim stopniu pogorszyło efektywność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w badanych roślinach rzepaku.
B. Równie niskie dawki azotu dostarczone roślinom rzepaku w postaci siarczanu amonu (N + S) umożliwiły wytworzenie większej ilości chlorofilu i zapewniły wyższą aktywność reakcji fotosyntezy w porównaniu z oddziaływaniem takich samych dawek azotu zaaplikowanych roślinom rzepaku w postaci azotanu amonu (tylko N).

4.5. Herbicydy – inhibitory fotosyntezy

4.5.1. Ocena fitotoksyczności prometryny oraz linuronu przy pomocy testu luminescencyjnego

Cel badań

Celem badań była ocena fitotoksycznego oddziaływania prometryny i linuronu na rośliny ogórka oraz opracowanie testu luminescencyjnego do szybkiej oceny skuteczności działania środków chwastobójczych – inhibitorów fotosyntezy.

Materiał i metody

Badano fitotoksyczność dwóch środków chwastobójczych należących do herbicydów - inhibitorów fotosyntezy: prometryny (h. metylotiotriazynowy) i linuronu (h. mocznikowy) [45]. Do badań wykorzystano krążki wycięte z liści ogórka (*Cucumis sativus* L.) odmiany Aladyn F1, który uprawiano w pojemnikach z piaskiem w TL-1, podlewając pożywką Hoaglanda (50%), przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 160 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h, w temperaturze 24°C/ 18°C, odpowiednio dzień/noc i wilgotności powietrza ok. 75%).
Po upływie 20 dni, gdy rośliny ogórka były w fazie 3 liści, ze środkowych części drugich liści wycinano po 4 krążki o średnicy 11 mm. Wodne roztwory herbicydów przygotowano w 9 stężeniach: 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 i 30 $\mu mol \cdot dm^{-3}$. Co 5 minut pobierano losowo krążki liściowe, które umieszczono kolejno: na powierzchni wody (próba kontrolna) oraz na powierzchni przygotowanych roztworów herbicydów. Szalki z krążkami na roztworach herbicydów

i szalki z próbami kontrolnymi zostały umieszczone w innym termoluminostacie (22°C, PPFD 120 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, wilgotność ok. 65%).

Po 4 godzinach pasywnej infiltracji badanych krążkach ogórka roztworami herbicydów przeprowadzono pomiar zaniku OL chlorofilu i wyznaczono parametr L_D [część 3.1.5]. Następnie obliczono względne zmiany wartości parametru L_D krążków poddanych działaniu herbicydów według zależności:

$$W(L_D) = L_{D\ HERBICYD} \cdot 100\% / L_{D\ KONTROLA}$$

gdzie: $L_{D\ HERBICYD}$ to wartość parametru otrzymanego przy pomiarze OL krążków poddanych działaniu herbicydów, a $L_{D\ KONTROLA}$ to wartość tego parametru dla krążków z liści ogórka inkubowanych przez 4 godziny na powierzchni wody.

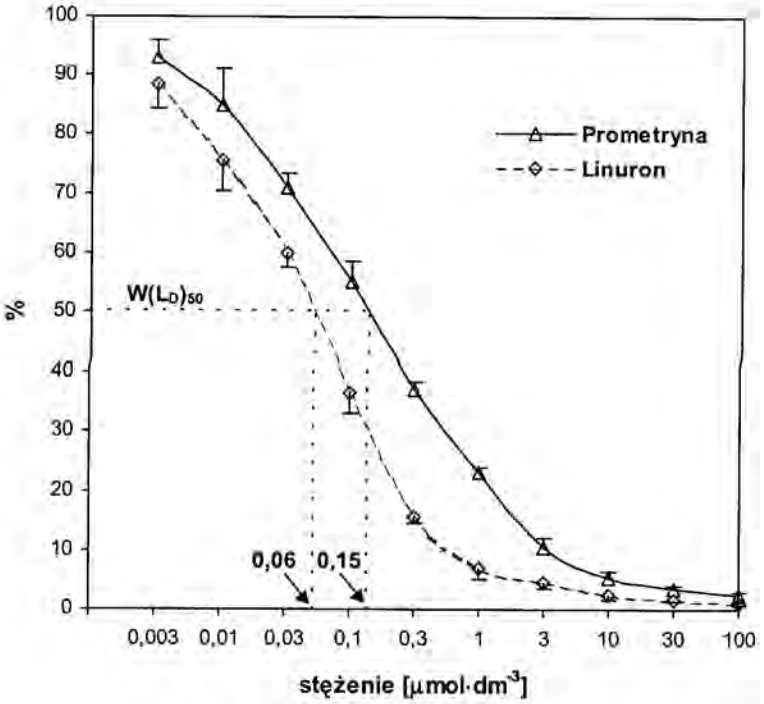
Bezwymiarowy parametr L_D informuje o szybkości FTE w PS II. Jako wskaźnik fitotoksyczności przyjęto stężenie herbicydu, przy którym $W(L_D)_{50} = 50\%$.

Dyskusja wyników

Na Rys. 24 przedstawiono przebieg zmian uśrednionych wartości $W(L_D)$ wraz z odchyleniami standardowymi. Na wykresie zaznaczono stężenia herbicydów, przy których wartości tego parametru zmniejszają się do połowy [$W(L_D)_{50}$]. Z przeprowadzonych pomiarów wynika, że dla młodych roślin ogórka bardziej szkodliwym okazał się linuron, bowiem przy dolistnym jego zaaplikowaniu $W(L_D)_{50}$ występuje przy stężeniu $0{,}6 \cdot 10^{-7}$ $mol \cdot dm^{-3}$, natomiast prometryna taki sam stopień inhibicji transportu elektronów powoduje dopiero przy stężeniu $1{,}5 \cdot 10^{-7}$ $mol \cdot dm^{-3}$.

Rutynowo stosowana jest metoda oceny fitotoksyczności herbicydów przy użyciu izolowanych chloroplastów oraz sztucznego donatora wodoru i wyrażana przez parametr pI_{50} [45]. Praca miała za cel sprawdzenie, czy podobną rolę mógłby spełniać szybki i prosty test z wykorzystaniem krążków liściowych, a stopień inhibicji fotosyntetycznego transportu elektronów (**FTE**) oceniany byłby przez względną zmianę wartości parametru L_D.

Proponowana, luminescencyjna metoda oceny fitotoksyczności jest mało pracochłonna, bowiem w ciągu 8 godzin pozwala wykonać 4 testy zależności „dawka - efekt" i określić wartość $W(L_D)_{50}$ w szerokim zakresie stężeń (nawet 4 rzędów). Na uwagę zasługuje możliwość zastosowania tego testu do szybkiej oceny toksycznego oddziaływania mieszanek znanych herbicydów, a także nowo zsyntetyzowanych środków chwastobójczych inhibitujących fotosyntezę.



Rys. 24. Oddziaływanie prometryny i linuronu na opóźnioną luminescencję chlorofilu w liściach ogórka. Objaśnienia w tekście.

Fig. 24. Influence of prometrine and linuron of delayed luminescence of chlorophyll in cucumber leaves. Description in the text.

Wnioski

A. Pomiar opóźnionej luminescencji chlorofilu zawartego w roślinach zielonych i glonach umożliwia szybką ocenę fitotoksyczności herbicydów lub innych substancji, które zakłócają fotosyntetyczny transport elektronów.

B. Opracowana luminescencyjna metoda testowa, pozwala w prosty i mało pracochłonny sposób określać wrażliwość, zarówno ochranianych roślin jak i zwalczanych chwastów na herbicydy należące do grupy inhibitorów fotosyntezy (np. herbicydy triazynowe, mocznikowe, diazynowe).

4.5.2. Ocena selektywnej odporności roślin buraka oraz wrażliwości roślin komosy na pyrazon i fenmedifan

Cel badań

Celem badań była ocena wrażliwości komosy oraz odporności roślin buraka na zalecane herbicydy z grupy inhibitorów fotosyntezy przy zastosowaniu pomiaru zaniku opóźnionej luminescencji chlorofilu.

Materiał i metody

Do badań toksyczności pyrazonu (h. diazynowego) i fenmedifanu (h. karbaminianowego) wybrano młode rośliny buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris* L.) oraz rośliny komosy białej (*Chenopodium album* L.) – pospolitego chwastu występującego dosyć często na urodzajnych glebach, a należącego do tej samej rodziny komosowatych (*Chenopodiaceae)* co burak.

Zarówno pyrazon jak i fenmedifan należą do grupy herbicydów będących inhibitorami fotosyntetycznego transportu elektronów [45]. Oba badane środki chwastobójcze są przeznaczone do zwalczania chwastów w uprawach buraków (cukrowych, ćwikłowych, pastewnych) ponieważ rośliny buraka dobrze tolerują, zarówno pyrazon jak i fenmedifan. Tolerancja roślin buraków na oba preparaty chwastobójcze związana jest z detoksykacją ich substancji aktywnych, które ulegają przemianom w specyficznych reakcjach biochemicznych [195].

Dojrzałe rośliny komosy były zbierane na terenach zielonych otaczających zabudowania Akademii Rolniczej w Szczecinie. Rośliny buraka uprawiano przez 25 dni na podłożu piaskowym w TL–1. Rośliny rosły przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 180 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h), podlewane pożywką Hoaglanda (50%), w temperaturze 18°C/15°C odpow. dzień/noc i wilgotności powietrza 70%. Do badań pobierano po 2 krążki o średnicy 11 mm wycinane ze środkowych części liści. W każdej serii było 6 par krążków wyciętych z liści należących do 6 roślin buraka.

Przed pomiarem kinetyki zaniku OL krążki liściowe inkubowano przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej, na powierzchni wody i przy umiarkowanym świetle (PPFD 120 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). W odstępach co minutę pobierano jeden krążek liściowy z każdej pary i kładziono na powierzchni roztworu pyrazonu o stężeniu 100 $\mu mol \cdot dm^{-3}$, natomiast drugi krążek z każdej pary umieszczono na powierzchni wody jako próbę kontrolną. Tak samo postępowano z parami krążków wyciętymi z liści komosy. Szalki z roztworami pyrazonu wraz z pływającymi na ich powierzchniach krążkami liściowymi oraz próby kontrolne umieszczano w termoluminostacie TL-1 (PPFD 120 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, temp. 22°C, wilgotność ok. 65%).

Po 4 godzinach pasywnej infiltracji próbek liści buraka i komosy roztworem pyrazonu, przeprowadzono na tych próbkach pomiary zaniku OL. Takie same pomiary OL wykonano na kontrolnych (inkubowanych na powierzchni wody) próbkach liści buraka i komosy.

Po pomiarach krążki poddawano restytucji umieszczając je na szalkach z wodą i wraz z próbą kontrolną pozostawiając na 24 godziny w termoluminostacie (temperatura pokojowa, słabe rozproszone światło). Po upływie doby powtórnie wykonywano na wszystkich krążkach pomiary OL chlorofilu.

Zarówno po pierwszym cyklu pomiarowym, jak i po restytucji obliczano dla każdej pary krążków parametr $W(L_D)$, czyli względną zmianę wartości współczynnika L_D:

$$W(L_D) = L_{D\ HERBICYD} \cdot 100\% / L_{D\ KONTROLA}$$

gdzie: $L_{D\ HERBICYD}$ to wartość współczynnika zaniku L_D [część 3.1.5] otrzymana dla krążka liściowego infiltrowanego roztworem pyrazonu, natomiast $L_{D\ KONTROLA}$ to wartość tego współczynnika dla drugiego krążka danej pary, którego inkubowano przez 24 godziny na powierzchni wody.

Takie same, pomiary i obliczenia wykonano na krążkach z liści buraka i komosy infiltrowanych roztworem fenmedifanu o stężeniu 100 $\mu mol \cdot dm^{-3}$. Wszystkie pomiary wykonywano w 6 powtórzeniach.

Średnie arytmetyczne wartości parametrów $W(L_D)$ obliczone dla liści buraka i komosy poddanych działaniu pyrazonu przedstawiono wraz z odchyleniami standardowymi w Tabeli 13, a poddanych działaniu fenmedifanu w Tabeli 14. Przy pomocy testu t-Studenta obliczono najmniejsze różnice istotne, które oznaczono: na poziomie 0,01 - **, a poziomie 0,001 - ***.

Dyskusja wyników

Pod wpływem kilkugodzinnego działania roztworu pyrazonu o stężeniu 100 $\mu mol \cdot dm^{-3}$ na liście komosy, wartość parametru $W(L_D)$ spadła do ok. 1% wartości kontroli z czego można wnioskować, że nastąpiło prawie całkowite zablokowania FTE w PS II [część 2.1.]. W liściach buraka pod wpływem pyrazonu wartość tego parametru obniżyła się do ok. 2,3% wartości kontroli (Tabela 13). Podobnie silną inhibicję, ale i pewne zróżnicowanie w reakcjach badanych roślin zarejestrowano po 4 godzinach infiltracji krążków liściowych buraka i komosy w roztworze fenmedifanu (Tabela 14). Porównując otrzymane wartości w tabelach można zauważyć, że przy jednakowych stężeniach obu herbicydów, wyższą fitotoksyczność przejawia pyrazon. Duże większe zróżnicowanie wyników pomiarów L_D otrzymanych dla liści

buraka i komosy poddanych działaniu obu herbicydów uwidoczniło się po jednodobowej restytucji (Tabele 13 i 14).

Tabela 13. Względne wartości współczynnika L_D - $W(L_D)\%$ wyznaczone dla liści buraka i komosy po ich infiltracji przez 4 h roztworem pyrazonu [100 $\mu mol \cdot dm^{-3}$] oraz wartości $W(L_D)$ dla tych samych liści wyznaczone po 24 godzinach restytucji (na powierzchni wody)

Table 13. Relative values of L_D coefficient, $W(L_D)\%$, for beetroot and pigweed leaves infiltrated with pyrazon solution [100 $\mu mol \cdot dm^{-3}$] for 4 hours and the $W(L_D)$ values obtained after 24-hour restitution (on water surface)

	Burak		Komosa
po 4 h działania pyrazonu; $W(L_D)\%$	2,32 ± 0,53	***	0,98 ± 0,06
po 24 h restytucji; $W(L_D)\%$	60,4 ± 4,2	***	4,57 ± 0,48

*** różnica istotna na poziomie 0,001.

Tabela 14. Względne wartości współczynnika L_D - $W(L_D)\%$ wyznaczone dla liści buraka i komosy po ich infiltracji przez 4 h roztworem fenmedifanu [100 $\mu mol \cdot dm^{-3}$] oraz wartości $W(L_D)$ dla tych samych liści wyznaczone po 24 godzinach restytucji (na powierzchni wody)

Table 14. Values of relative changes in L_D coefficient, $W(L_D)\%$, for beetroot and pigweed leaves infiltrated with fenmedifan solution [100 $\mu mol \cdot dm^{-3}$] for 4 hours and the $W(L_D)$ values obtained after 24-hour restitution (on water surface)

	Burak		Komosa
po 4 h działania fenmedifanu; $W(L_D)\%$	4,24 ± 0,81	**	3,23 ± 0,48
po 24 h restytucji; $W(L_D)\%$	43,9 ± 9,9	***	4,15 ± 0,17

*** różnica istotna na poziomie 0,001.

W krążkach z liści buraka poddanego wcześniej działaniu pyrazonu względna wartość L_D po 24 h restytucji przekroczyła 60% wartości kontroli, a w liściach buraka poddanego wcześniej działaniu fenmedifanu, zwiększyła się po fazie restytucji ponad dziesięciokrotnie (do 44% kontroli). Natomiast w krążkach komosy potraktowanych tymi herbicydami, po okresie restytucji względne wartości L_D wzrosły zaledwie do ok. 5% wartości kontroli. Uzyskane wyniki świadczą, że mechanizmy detoksykacyjne w komórkach buraka w znacznym stopniu odtworzyły

aktywność FTE. Transport elektronów w aparacie fotosyntetycznym roślin komosy uległ prawie całkowitej blokadzie i w konsekwencji nie mogą zachodzić reakcje fazy świetlnej fotosyntezy i w krótkim czasie co spowoduje całkowitą eliminację tych roślin.

Wnioski

A. Badane herbicydy (pyrazon i fenmedifan) są silnymi inhibitorami fotosyntezy i w zastosowanym stężeniu 100 $\mu mol \cdot dm^{-3}$, znacznie obniżyły efektywność transportu elektronów w PS II, zarówno w liściach buraka jak i komosy.
B. Tolerancja roślin buraka na pyrazon oraz fenmedifan nie ujawniła się w pełni podczas pierwszych godzin wnikania tych substancji do mezofilu badanych liści, natomiast efekt przywrócenia sprawności funkcji PS II nastąpił po dłuższym czasie (jednodobowej restytucji), co może świadczyć o biochemicznych mechanizmach odporności roślin buraka na oba badane herbicydy.
C. Zastosowany test luminescencyjny pozwala na szybką ocenę selektywność herbicydów - inhibitorów fotosyntezy oraz ujawnienie zróżnicowanego działanie fitotoksycznego na poszczególne gatunki chwastów i rośliny uprawne.

4.5.3. Badanie fitotoksycznego oddziałania atrazyny, azyprotryny i linuronu na rośliny rzepaku triazynoodpornego oraz rzepaku wrażliwego na herbicydy – inhibitory fotosyntezy

Cel badań

Celem badań była ocena wpływu herbicydów z różnych grup inhibitorów transportu elektronów na reakcje fazy świetlnej procesu fotosyntezy w liściach rzepaku wykazującego normalną wrażliwość herbicydową w liściach rzepaku posiadającego cechę triazynoodporności.

Materiał i metody

Badano oddziaływanie atrazyny i azyprotryny (h. triazynowych) oraz linuronu (h. mocznikowego) [108] na młode rośliny rzepaku ozimego (*Brassica napus var. oleifera*) odm. Lirajet oraz rośliny rzepaku należące do triazynoodpornego rodu (TR) 5972/2/89[1]. Rośliny rzepaku rosły 18 dni w TL-1 na podłożu piaskowym podlewane pożywką Hoaglanda (50%), przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 150 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h), w temperaturze 18°C/15°C odpowiednio dzień/noc i wilgotności powietrza ok. 70%.

[1]Nasiona rzepaku należące do rodu 5972/2/89 otrzymano z IHAR Poznań

Do badań pobierano po 4 krążki o średnicy 11 mm, wycinane ze środkowych części II liścia. Przed pomiarami zaniku OL chlorofilu, krążki liściowe inkubowano przez jedną godzinę na powierzchni wody przy umiarkowanym świetle (PPFD 120 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). W odstępach co minutę pobierano po jednym krążku i kładziono na powierzchni wody (kontrola; 6 sztuk) do oddzielnych szalek, a następnie na powierzchniach roztworów: azyprotryny, atrazyny i linuronu (każda seria także po 6 sztuk). Wszystkie roztwory herbicydów posiadały stężenie 4 $\mu mol \cdot dm^{-3}$.

Krążki liściowe na roztworach herbicydów oraz próby kontrolne umieszczano w TL-1 (temperaturze. 22°C, PPFD 120 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, wilgotność ok. 65%). Po 4 godzinach pasywnej infiltracji roztworami herbicydów przeprowadzono pomiary zaniku OL chlorofilu oraz rejestrowano przebiegi IFL chlorofilu we wszystkich badanych próbkach liści rzepaku.

Wyznaczono parametry luminescencji chlorofilu: F_V/F_M, A_M, Rfd oraz L_D [część 2.1.2.]. Pomiary IFL wykonywano przy użyciu fluorymetru, a rejestrację OL przy użyciu wysokoczułego luminometru [część 3.1.]. Uśrednione wartości parametrów luminescencji prób kontrolnych (krążki na wodzie) obu genotypów rzepaku zamieszczono w Tabeli 15. Każda z tych wartości jest średnią arytmetyczną z 6 powtórzeń. Obliczono najmniejsze istotne różnice (NIR) przy pomocy testu t-Studenta na poziomie istotności 0,05, 0,01 i 0,001, oznaczając je odpowiednio jedną, dwiema lub trzema gwiazdkami.

Następnie obliczono (tak jak w podrozdziale 4.5.2) względne wartości współczynnika zaniku OL chlorofilu - $W(L_D)$ oraz względne zmiany wartości parametrów IFL chlorofilu - W(X):

$$W(X) = X_{HERBICYD} \cdot 100\% / X_{KONTROLA},$$

gdzie: $X_{HERBICYD}$ to wartości parametrów X (F_V/F_M, A_M i Rfd) dla krążków liściowych poddanych przez 4 godziny pasywnej infiltracji roztworami herbicydów, a $X_{KONTROLA}$ to wartości tych parametrów dla krążków liściowych, inkubowanych przez 4 godziny na powierzchni wody.

Średnie arytmetyczne (6 powtórzeń) z wykonanych obliczeń przedstawiono w Tabeli 15. Na podstawie analizy wariancji obliczono najmniejsze istotne różnice (NIR) przy pomocy testu Tukey'a na poziomie istotności 0,05.

Dyskusja wyników

Z wartości parametrów danych w Tabeli 15 wynika, że sprawność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w roślinach rzepaku TR istotnie odbiega od sprawności tych reakcji u roślin rzepaku odm. Lirajet posiadających prawidłowo ukształtowaną białkową strukturę PS II [część 2.2.3.]. Badając metodami luminescencyjnymi

sprawność reakcji fotochemicznej w PS II, zmianę efektywności transportu elektronów oraz potencjalną zdolność do procesu fotosyntezy w liściach roślin TR, można te modyfikacje przyrównać do negatywnych zmian w przebiegu reakcji fazy świetlnej fotosyntezy wykryte w chwastach posiadających podobną anomalię genetyczną [71,134,140,172].

Tabela 15. Uśrednione wartości parametrów luminescencyjnych dla liści rzepaku odmiany Lirajet oraz triazynoodpornego rodu 5972/2/89 - TR

Table 15. Mean values of luminescence parameters for leaves of two oilseed rape: cultivar Lirajet and triazine-resistant line 5972/2/89 - TR

Parametr	F_V/F_M		A_M		Rfd		L_D	
	Lirajet	TR	Lirajet	TR	Lirajet	TR	Lirajet	TR
	0,789	0,693	17,8	16,9	3,89	2,12	249	12,4
	± 0,013	±0,008	± 0,6	± 1,6	± 0,17	± 0,22	± 15	± 0,6
	***		b.r.		***		***	

*** różnica istotna na poziomie 0,001, b.r. – brak różnicy.

Uwagę zwraca bardzo duża (ponad 20 krotna!) różnica między wartością wskaźnika L_D dla roślin odm. Lirajet, a uśrednioną wartością tego wskaźnika wyznaczoną dla roślin rzepaku TR. Wskaźnik L_D związany z prędkością zaniku OL chlorofilu informuje o szybkości przekazywania elektronu od akceptora Q_A do Q_B w PS II [część 2.1.2.]. Zmiany konformacyjne w białku D1 wiążącym Q_B spowodowane niewielką zmianą w sekwencji aminokwasów (charakterystyczną dla roślin triazynoodpornych) powodują spowolnienie przepływu elektronów i w konsekwencji, spadek wartości L_D [część 2.2.3]. Zakłócenie FTE wpłynęło także na znaczne obniżenie wartości parametru Rfd (do ok. 54%) co świadczy, że rośliny TR mają mniejszą potencjalną zdolność do fotosyntezy. Również wartość parametru F_V/F_M, który informuje o maksymalnej wydajności reakcji fotochemicznej w PS II jest u roślin TR ok. 12% niższa od wartości tego parametru u odm. Lirajet. Najmniej zróżnicowane są wartości parametru A_M co świadczy, że warunkach przeprowadzanego eksperymentu (przy umiarkowanym natężeniu światła wzbudzającego; PPFD 125 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) nie ma istotnej różnicy pomiędzy liczebnością puli mobilnych plastochinonów u roślin TR i u roślin rzepaku odm. Lirajet.

W Tabeli 16 zebrano wyniki przeprowadzonych badań nad wpływem trzech różnych herbicydów należących do wspólnej klasy inhibitorów fotosyntezy i zastosowanych w jednakowych stężeniach molowych, na krążki liści rzepaku odm. Lirajet oraz rzepaku triazynoodpornego rodu 5972/2/89. Dla roślin rzepaku odmiany Lirajet najbardziej toksyczny okazał się linuron popularny herbicyd mocznikowy. Pod jego wpływem znacznie, bo aż o ok. 67% obniżyła się wartość wskaźnika witalności Rfd, natomiast w sposób drastyczny (bo do poziomu 5% wartości kontroli) zmniejszył się parametr L_D, co wskazuje na bardzo silną inhibicję FTE.

Najmniej szkodliwym herbicydem dla roślin rzepaku okazała się azyprotryna (h. metylotiotriazynowy, s.a. Mesoranilu). Jeszcze niedawno preparat Mesoranil 50 WP był stosowany do odchwaszczania upraw rzepaku i być może celowe byłoby przeprowadzenie szerzej zakrojonych badań nad przydatnością tego niskotoksycznego herbicydu (np. w mieszankach) do eliminacji wielu uciążliwych chwastów dwuliściennych [108].

Rośliny rzepaku TR wykazywały ogólnie wyższą (od roślin odm. Lirajet) odporność na zastosowane herbicydy, z wyjątkiem linuronu, który i w tym przypadku okazał się względnie silnym inhibitorem reakcji fazy świetlnej fotosyntezy. Mniejszy wpływ na obniżenie efektywności reakcji fotochemicznej w PS II oraz na wartość wskaźnika Rfd miały herbicydy triazynowe (azyprotryna i atrazyna), co potwierdza informacje o odporności roślin tego rodu na h. triazynowe [120,121]. Zróżnicowanie reakcji liści rzepaku TR na herbicydy triazynowe i linuron (h. mocznikowy) odpowiada podobnie zróżnicowanej reakcji triazynoodpornych biotypów chwastów *Senecio vulgaris* L. i *Amarantus retroflexus* L. [45,140].

Godną uwagi jest także różnica w stopniu inhibicji FTE w liściach roślin TR poddanych działaniu atrazyny (h. z podgrupy chlorotriazyn) i w liściach roślin tego samego rodu poddanych działaniu azyprotryny (h. z podgrupy metylotiotriazyn). W pierwszym przypadku wartość $W(L_D)\%$ jest niższa tylko o 12,5%, a w drugim aż o 29%.

Stosując metody biochemiczne z wykorzystaniem izolowanych chloroplastów lub metodę IFL chlorofilu, można wykrywać i rozróżniać rośliny odporne na h. triazynowe lub mocznikowe [3,36]. Przy zastosowaniu detekcji OL chlorofilu można wykonywać takie testy, nie tylko z dużo wyższą czułością, a także dodatkowo oceniać stopień zróżnicowania odporności badanych roślin na herbicydy chlorotriazynowe i metylotiotriazynowe.

Tabela 16. Uśrednione względne wartości zmian parametrów luminescencyjnych dla liści rzepaku odmiany Lirajet oraz triazynoodpornego rodu 5972/2/89

Table 16. Mean values of relative changes of luminescence parameters for leaves of two oilseed rape cultivars: Lirajet and triazine-resistant line 5972/2/89

Cecha	Biotyp [B]	Herbicyd [H]			
		azyprotryna	atrazyna	linuron	średnia
$W(F_V/F_M)\%$	Lirajet	96,9	88,7	88,8	91,5
	TR	97,5	95,5	89,0	94,0
	Średnia	97,2	92,1	88,9	
	$NIR_{0,05}$	H-2,3	B-1,6	HxB-3,3	
W(Rfd)%	Lirajet	74,1	45,7	33,3	51,0
	TR	98,2	98,1	41,3	79,2
	Średnia	86,1	71,9	37,3	
	$NIR_{0,05}$	H-5,3	B-3,6	HxB-7,7	
$W(L_D)\%$	Lirajet	27,2	20,6	5,3	17,7
	TR	70,9	87,5	23,4	60,6
	średnia	49,0	54,0	14,3	709
	$NIR_{0,05}$	H-1,4	B-0,97	HxB-1,8	

Wnioski

A. Rośliny rzepaku triazynoodpornego rodu 5972/2/89, w których nastąpiła mutacja chloroplastowego genu *psb* A (czego następstwem jest modyfikacja struktury i funkcji PS II) wykazują charakterystyczne zmiany w przebiegu indukcji fluorescencji oraz opóźnionej luminescencji chlorofilu mogące służyć do identyfikacji podobnych genotypów.

B. Z porównania wartości parametrów indukcji fluorescencji oraz opóźnionej luminescencji chlorofilu wyznaczonych dla roślin rzepaku odmiany Lirajet oraz dla rodu 5972/2/89 wynika, że rośliny triazynoodporne wykazywały niższą zdolność do efektywnej konwersji energii świetlnej w fazie świetlnej fotosyntezy.

C. Z analizy parametrów luminescencji chlorofilu można wnioskować, że przebieg reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w chloroplastach rzepaku odmiany Lirajet najmniej zostały zakłócony przez azyprotrynę, a najsilniejszym inhibitorem tych reakcji okazał się linuron.

D. Rośliny rzepaku należące do rodu triazynoodpornego wykazały ogólnie większą odporność na zastosowane herbicydy - inhibitory fotosyntezy w porównaniu z roślinami rzepaku odmiany Lirajet, które posiadają prawidłowy zestaw genów chloroplastowych.
E. Mutacja genu *psb* A w chloroplastach rzepaku triazynoodpornego najskuteczniej chroni transport elektronów w PS II przed działaniem atrazyny (h. chlorotriazynowego), mniej skutecznie przed azyprotryną (h. metylotiotriazynowego) i w niewielkim stopniu przed działaniem linuronu (h. mocznikowego).

4.5.4. Fotograficzna rejestracja zmiany wydajności fluorescencji chlorofilu w liściach fasoli pod wpływem atrazyny

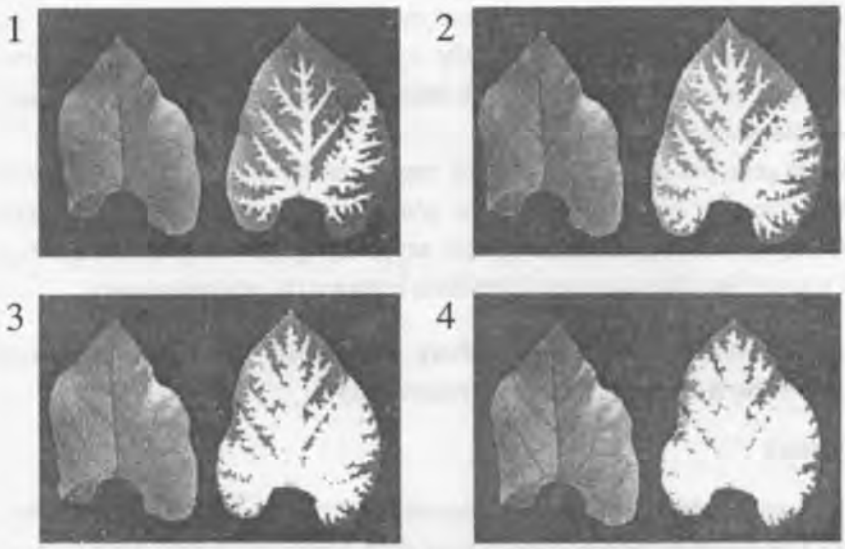
Cel badań

Celem pracy było wykazanie możliwości praktycznego zastosowania metody fotograficznej do rejestracji szybkości oraz dróg penetracji tkanek asymilacyjnych roślin przez herbicydy należące do grup inhibitorów transportu elektronów, a tym samym szybkiej oceny fitotoksyczności środków chwastobójczych blokujących proces fotosyntezy.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano liście fasoli (*Phaseolus vulgaris* L. odm. Saksa) uprawianej przez 10 dni w termoluminostacie TL-1. Rośliny rosły na podłożu piaskowym, podlewane pożywką Hoaglanda (50%) przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 120 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h] w temperaturze 22°C/16°C, odpowiednio dzień/noc i wilgotności ok. 70%.

Do badań pobierano pierwsze, dobrze rozwinięte liście, których ogonki liściowe natychmiast po odcięciu zanurzano w naczyniach z wodą (kontrola) lub z roztworem preparatu Gesaprim 50 WP o stężeniu 66 $mg \cdot dm^{-3}$, co odpowiadało stężeniu ok. 100 µmoli atrazyny będącej substancją czynną tego herbicydu. Naczynia wraz z odciętymi liśćmi umieszczano na stanowisku do makrofotografii, które opisano i przedstawiono w podrozdziale 3.1.4. W tym samym podrozdziale opisano zastosowaną metodykę fotograficznej rejestracji fluorescencji chlorofilu. Fluorescencję chlorofilu ($\lambda = 680 \div 740$ nm) w liściach fasoli wzbudzano mono-chromatycznym światłem lamp sodowych ($\lambda_{max} = 589$ nm). Liście fotografowano co 30 minut, a przykładową serię zdjęć zamieszczono na Fot. 1.



Fot. 1. Fotograficznie rejestrowane obrazy fluorescencji chlorofilu w odciętych liściach fasoli, do których w sposób pasywny wnika woda (liść po lewej) lub wodny roztwór herbicydu Gesaprim 50 WP w stężeniu 66 ppm (liść po prawej). Zdjęcia wykonywano po: 30 min. (1), 60 min. (2), 90 min. (3) i 120 min. (4) od rozpoczęcia eksperymentu. Objaśnienia w części 4.5.4.

Photo. 1. Photographic images of chlorophyll fluorescence in cut-off leaves of bean, passively penetrated by water (left leaf) or 66 ppm water solution of herbicide Gesaprim 50 WP. The photographs taken at 30 min. (1), 60 min. (2), 90 min. (3) and 120 min. (4) from the beginning of the experiment. Details in Chapter 4.5.4.

Dyskusja wyników

Obraz liścia kontrolnego jest ciemny co świadczy o małej wydajności stacjonarnej FL chlorofilu, która nie przekracza w normalnych warunkach kilku procent pochłoniętego promieniowania PAR [część 2.1.1.]. Do liścia umieszczonego po prawej stronie fotografii, w wyniku transpiracji wciągany jest wodny roztwór herbicydu, którego substancją czynną jest atrazyna będąca silnym inhibitorem reakcji fazy świetlnej fotosyntezy. Roztwór ten przemieszcza się szybko poprzez główne wiązki naczyń i już po 30 min. osiąga krańce liścia. Po godzinie roztwór herbicydu dotarł do ok. połowy tkanek mezofilu blokując fotosyntetyczny transport elektronów o czym świadczy skokowy wzrost wydajności FL chlorofilu na dość znacznej części powierzchni blaszki liściowej. Dalsze przemieszczanie się fitotoksycznego roztworu odbywa się nieco wolniej (głównie poprzez plazmodesmy) i po następnej godzinie ok. 90% tkanek liścia jest fotosyntetycznie nieczynnych.

Herbicydy – inhibitory fotosyntezy, z racji ich niskiej toksyczności, dobrej selektywności, a także przystępnej ceny są wciąż popularne i stosowane w praktyce rolniczej oraz ogrodniczej. Pod wpływem tych h. następuje inhibicja reakcji fazy świetlnej fotosyntezy i znaczny wzrost wydajności FL chlorofilu. Dla specjalistów od ochrony roślin interesujące są informacje o szybkości wnikania aktywnych substancji chwastobójczych do komórek roślinnych, drogach ich przemieszczania się w tkankach asymilacyjnych, a także zdolności roślin do ich metabolizowania i neutralizacji. Umożliwia to dobór właściwego herbicydu do selektywnej eliminacji chwastów w ich siedliskach.

Istotnym problemem przy produkcji środków chwastobójczych jest dobór najlepszego nośnika oraz specjalnych dodatków (nazywanych adiuwantami), które ułatwiają penetrację substancji aktywnej do wnętrza rośliny. Częściową odpowiedź na te pytania można uzyskiwać w eksperymentach z preparatami znakowanymi radioizotopami wykonując radiogramy. Proponowana metoda z wykorzystaniem FL chlorofilu do fotograficznej rejestracji dróg i prędkości przemieszczania się h. inhibitorów fotosyntezy w tkankach roślin oraz oceny ich fitotoksyczności ma szereg zalet i z powodzeniem może częściej zastępować kosztowne metody radioizotopowe.

Innym polem zastosowania metody fotograficznej rejestracji wydajności fluorescencji chlorofilu może być jej wykorzystanie do oceny wpływu czynników stresowych na efektywność fotosyntezy, a pośrednio na stan fizjologiczny roślin. Wydajność FL chlorofilu w zielonych tkankach roślin jest zwykle ujemnie skorelowana ze sprawnością reakcji fazy świetlnej fotosyntezy [część 2.1.1.]. Efektywność całego procesu fotosyntezy zmienia się podczas ontogenezy rośliny i w znacznym stopniu zależy od jej uwarunkowań genetycznych. Większość czynników stresowych zakłóca przebieg reakcji fotosyntezy i niejednokrotnie wywołuje wczesne zmiany strukturalne na poziomie subkomórkowym niezauważalne dla obserwatora. Dla ekofizjologów istotna jest lokalizacja w liściach miejsc specjalnie wrażliwych na dany czynnik stresowy (np. ozon, tlenki siarki i azotu, UV-B, smog fotochemiczny), ocena stopnia ich destrukcji, a także zdolności roślin do restytucji tych uszkodzeń. Zastosowanie fotograficznych aparatów cyfrowych uczulonych w dalekiej czerwieni i współdziałających z komputerami z pewnością rozszerzy możliwości zastosowania tej fluorescencyjnej techniki badawczej w ochronie roślin i ekofizjologii.

Wnioski

A. Zastosowana technika wzbudzania fluorescencji chlorofilu w liściach oraz fotograficzna rejestracja tego świecenia pozwala na wizualną ocenę prędkości wnikania roztworów herbicydów (z grupy inhibitorów fotosyntezy) i dróg ich penetracji w tkankach mezofilu.

B. Przedstawiona metoda fotograficznej oceny wydajności fluorescencji chlorofilu w sposób pośredni informuje o efektywności procesu fotosyntezy i dlatego może stać się dla ekofizjologów cennym źródłem wiadomości o miejscach działania szeregu czynników stresowych, mechanizmach uszkodzeń struktur i funkcji komórkowych oraz o ogólnym stanie fizjologicznym roślin.

4.6. Fotoinhibicja i stres oksydacyjny

4.6.1. Reakcja roślin dwóch zróżnicowanych genotypów rzepaku na zwiększone napromieniowanie PAR

Cel badań

Celem badań była ocena wpływu podwyższonego poziomu promieniowania PAR na reakcje fazy świetlnej fotosyntezy w liściach rzepaku posiadającego prawidłowy genom chloroplastowy oraz w liściach rzepaku wykazującego cechę triazynoodporności.

Materiał i metody

Badano wpływ podwyższonego promieniowania PAR na przebieg reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w liściach młodych roślin rzepaku ozimego (*Brassica napus var. oleifera*) odmiany Lirajet (LJ) oraz triazynoodpornego rodu (TR) 5972/2/89[2]. Rośliny rosły 18 dni w termoluminostacie TL-1 na podłożu piaskowym, podlewane pożywką Hoaglanda (50%), przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 150 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h), w temperaturze 18°C/15°C odpowiednio dzień/noc i wilgotności powietrza ok. 70%.

Do badań pobierano 6 w pełni rozwiniętych liści (pierwszy liść) należących do obu badanych genotypów. Ze środkowych części każdego liścia wycinano po 2 krążki o średnicy 11 mm i umieszczano na powierzchni wody w szalkach. Jeden z tych krążków stanowił element wariantu kontrolnego (**K**), a drugi należał do

[2] Nasiona rzepaku należące do rodu 5972/2/89 otrzymano z IHAR Poznań

wariantu poddanego podwyższonemu napromieniowaniu (**S**). Szalki należące do wariantu **K**, umieszczono w TL-1 (PPFD 120 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, temp. 22°C, wilgotność ok. 65%). Szalki należące do wariantu **S**, umieszczono w termoluminostacie TL-A3 (PPFD 700 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, temp. 22°C, wilgotność ok. 65%). Po 2 godzinach ekspozycji na podwyższony poziom promieniowania przeprowadzono pomiary IFL chlorofilu w liściach rzepaku serii **S** i **K** wyznaczając parametry: F_V/F_M, A_M oraz Rfd [część 3.1.1.]. Powyższe pomiary wykonano na krążkach z liści rzepaku LJ i TR.

W Tabeli 17 zamieszczono średnie arytmetyczne (6 powtórzeń) wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu wyznaczone dla wariantów **K** oraz **S** obu badanych genotypów. Następnie wyliczono względne zmiany wartości każdego parametru IFL chlorofilu (X to odpowiednio: F_V/F_M, A_M lub Rfd) spowodowane podwyższonym napromieniowaniem i oznaczono je jako:

$$W(X) = X_S/X_K,$$

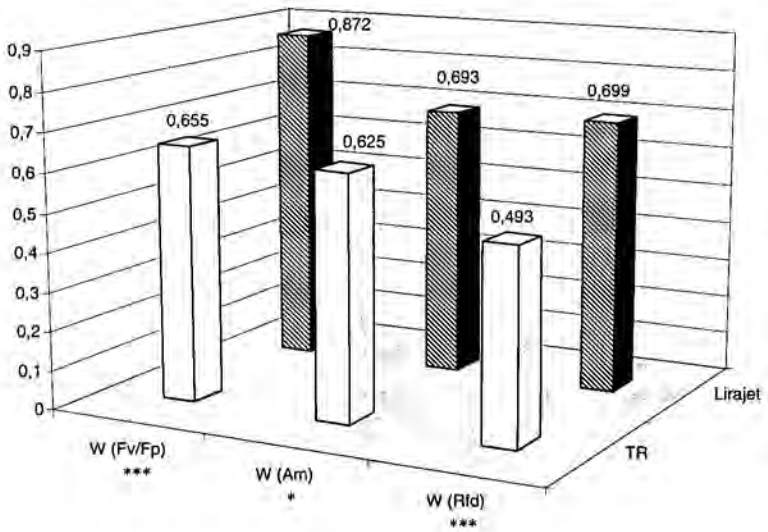
gdzie: X_S to wartości poszczególnych parametrów (F_V/F_M, A_M i Rfd) wyznaczone dla krążków poddanych przez 2 godziny podwyższonemu napromieniowaniu – wariant **S**, a X_K to wartości tych samych parametrów wyznaczone dla krążków liściowych z wariantu **K**.

Tabela 17. Uśrednione wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu dla roślin rzepaku odm. Lirajet i triazynoodpornego rodu (TR) 5972/2/89, poddanych stresowi podwyższonego promieniowania (**S**) oraz nie wykazujących uszkodzeń fotoinhibicyjnych (**K**)

Table 17. Average values of chlorophyll fluorescence induction parameters for oilseed rape of cv. Lirajet and triazine-resistant line 5972/2/89 (TR) subjected to enhanced irradiation (**S**) and showing no photoinhibition disturbances (**K**)

		F_V/F_M	A_M	Rfd
Lirajet	K	0,789 ± 0,013	18,0 ± 0,89	3,89 ± 0,17
	S	0,687 ± 0,020	12,5 ± 1,5	2,72 ± 0,19
	NIR	***	***	***
TR	K	0,693 ± 0,008	17,3 ± 2,1	2,12 ± 0,22
	S	0,454 ± 0,049	10,8 ± 1,2	1,05 ± 0,11
	NIR	***	***	***

Wartości ilorazów przedstawiono w postaci diagramów na Rys. 25. Wartość każdego diagramu jest średnią arytmetyczną z 6 powtórzeń. Na podstawie analizy wariancji obliczono najmniejsze istotne różnice (NIR) przy pomocy testu t-Studenta na poziomie istotności 0,05; 0,01 i 0,001 i oznaczano odpowiednio: jedną, dwiema lub trzema gwiazdkami.



Rys. 25. Względne wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu (kontrola = 1,0) w liściach rzepaku odm. Lirajet oraz triazynoodpornego rodu rzepaku 5972/2/89 poddanych działaniu sześciokrotnie podwyższonego promieniowania PAR. Szczegóły w tekście.

Fig. 25. Relative values of chlorophyll fluorescence induction parameters (to control = 1.0) in oilseed rape of cv. Lirajet and triazine-resistant line 5972/2/89 subjected to six-fold increased PAR. Description in text.

Dyskusja wyników

Z danych zawartych w Tabeli 17 wynika, że pod wpływem podwyższonego promieniowania PAR (wariant **S**), nastąpiło znaczne obniżenie wartości trzech wyznaczonych parametrów IFL chlorofilu, co świadczy, że w liściach obu badanych genotypów rzepaku nastąpiły zakłócenia w przebiegu fazy świetlnej fotosyntezy [część 2.1.]. Zakłócenia te ujawniły się szczególnie silnie u roślin należących do TR. W liściach roślin z wariantu **S** nastąpiło istotne obniżenie wartości parametru F_V/F_M co jest charakterystyczną reakcją aparatu fotosyntetycznego na nadmierne

napromieniowanie i sygnalizuje o uszkodzeniach fotoinhibicyjnych w PS II. W podobnym stopniu obniżyła się wartość A_M, co świadczy o istotnym zmniejszeniu puli akceptorów w PS II. Silne napromieniowanie spowodowało również obniżenie wartości wskaźnika Rfd (u roślin TR nawet o 50%).

Z porównania diagramów na Rys. 25 wynika, że względne wartości parametrów związanych z efektywnością reakcji fazy świetlnej fotosyntezy, $W(F_V/F_M)$ i $W(A_M)$ są w istotnym stopniu mniejsze u roślin TR, a względna wartość wskaźnika witalności, W(Rfd) wyznaczona dla tych roślin nie osiągnęła nawet połowy wartości w kontroli co świadczy, że w tych samych warunkach stresowych większym uszkodzeniom fotoinhibicyjnych uległy rośliny rzepaku z genetycznie zmienionym białkiem D1 w porównaniu z roślinami LJ [część 2.2.3.]. Szczególnie duży spadek wartości Rfd u roślin TR świadczy, że najprawdopodobniej pod wpływem zastosowanego stresu świetlnego, nastąpiła inaktywacja enzymów odpowiedzialnych za asymilację CO_2 w ciemnej fazie fotosyntezy [część 2.1.].

Wnioski

A. Sześciokrotne podwyższenie natężenia promieniowania w zakresie PAR wywołało po 2 godzinach ekspozycji, istotne obniżenie wartości wszystkich wyznaczanych parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu w liściach obu badanych genotypów rzepaku.

B. Efekty fotoinhibicyjne (oceniane poprzez zmianę wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu) były bardziej uwydatnione w tkankach liści należących do rzepaku triazynoodpornego, w porównaniu ze zmianami jakie zarejestrowano w liściach rzepaku odm. Lirajet posiadającego prawidłowy genom chloroplastowy.

C. Zwiększone napromieniowanie silnie obniżyło wartość wskaźnika witalności (szczególnie w liściach rzepaku triazynoodpornego) co świadczy, że uszkodzenia fotoinhibicyjne ujawniły się nie tylko poprzez zakłócenia reakcji fazy świetlnej fotosyntezy, ale spowodowały również dezaktywację enzymów uczestniczących w ciemnej fazie fotosyntezy.

D. Uzyskane wyniki w dużym stopniu wyjaśniają dlaczego, w warunkach uprawy polowej triazynoodporne rody rzepaku wykazują niższą produktywność fotosyntetyczną w porównaniu z produktywnością tradycyjnych form tej rośliny.

4.6.2. Wpływ zwiększonego napromieniowania PAR na fluorescencję chlorofilu w liściach ogórka uprawianego przy zmniejszonym lub zwiększonym stężeniu CO_2

Cel badań

Celem podjętych badań była ocena oddziaływania zwiększonego poziomu PAR na reakcje fazy świetlnej fotosyntezy roślin ogórka, które były przez 7 dni aklimatyzowane w atmosferze z obniżonym do 150 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$, podwyższonym do 700 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$ oraz zbliżonym do naturalnego [ok. 350 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$] stężeniem dwutlenku węgla.

Materiał i metody

Badano rośliny ogórka (*Cucumis sativus* L.) odm. Wisconsin, które uprawiano w pojemnikach z piaskiem i podlewano pożywką Hoaglanda (50%). Rośliny rosły w termoluminostacie TL-1 przy oświetleniu lampami LRFR 400 (PPFD 120 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$, fotoperiod 12 h, temp. 22°C/18°C odpowiednio dzień/noc, wilgotność powietrza ok. 75%). Po upływie 14 dni rośliny ogórka podzielono na 3 grupy, w każdej 6 roślin. Pierwszą z nich (I) przeniesiono do TL-RWD, w którym stężenie CO_2 utrzymywano na poziomie zbliżonym do naturalnego {[350 ± 15] $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$}, drugą (II) umieszczono w TL-RWD, w którym stężenie CO_2 podwyższono do {[700 ± 25] $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$}, trzecią (III) umieszczono w TL-RWD, gdzie stężenie CO_2 zostało obniżone do wartości {[150 ± 10] $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$}. Pozostałe parametry klimatyczne utrzymywano w termoluminostatach na poziomie warunków dotychczasowego wzrostu. Po 7 dobach, gdy rośliny były w fazie 2-3 liści, z najmłodszego w pełni rozwiniętego liścia wycinano po dwa krążki o średnicy 11 mm, które umieszczano na powierzchni wody (każdy krążek w oddzielnej szalce). W taki sposób uzyskano 2 serie (**K** i **S**) po 6 sztuk krążków każda.

Krążki z liści roślin grupy I należące do pierwszej serii i oznaczonej jako $\mathbf{K_I}$ umieszczono na dwie godziny w termoluminostacie, gdzie utrzymywane były warunki dotychczasowego wzrostu (PPFD 120 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$, temp. 22°C; wilgotność 75%, stężenie CO_2 ok. 350 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$). Krążki liściowe należące do drugiej serii ($\mathbf{S_I}$) umieszczano na dwie godziny w termoluminostacie TL-A3 (PPFD 700 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$, temp. 22°C; wilgotność 75%, stężenie CO_2 ok. 350 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$). Po 2 godzinach inkubacji na krążkach obu serii ($\mathbf{K_I}$ oraz $\mathbf{S_I}$) wykonano pomiary IFL chlorofilu i wyznaczono parametry: F_V/F_M, A_M i Rfd [część 2.1.2.]. Opisaną procedurę pomiarową powtórzono następnie dla obu serii krążków z grupy II i grupy III.

W Tabeli 18 zamieszczono średnie arytmetyczne (z 6 powtórzeń wraz z odchyleniami standardowymi) wartości parametrów IFL chlorofilu wyznaczonych dla krążków liściowych z serii K (nie poddawanych zwiększonemu napromieniowaniu) trzech badanych grup roślin ogórka, a także najmniejsze istotne różnice ($NIR_{0,05}$) między wartościami tych parametrów na poziomie istotności 0,05.

Tabela 18. Wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu w liściach roślin ogórka rosnących przez 7 dni w atmosferze zawierającej: 350 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$ (I), 700 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$ (II) oraz 150 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$ (III)

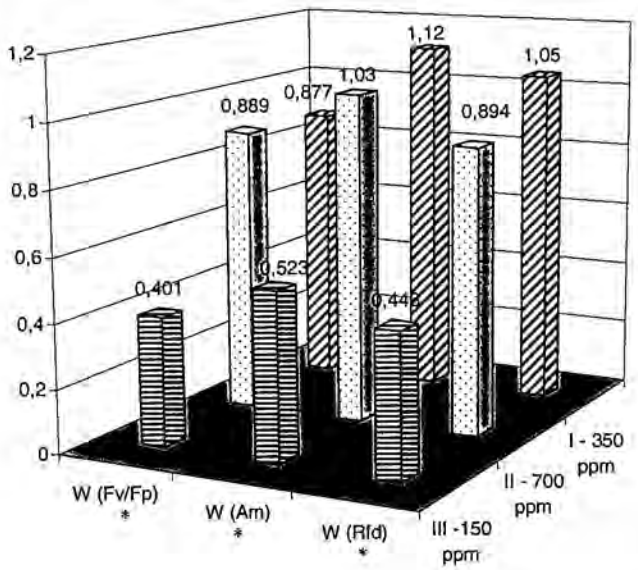
Table 18. Values of chlorophyll fluorescence induction parameters of cucumber leaves for 7 days growing in atmosphere containing: 350 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$ (I), 700 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$ (II) and 150 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$ (III)

Stężenie CO_2	F_V/F_M	A_M	Rfd
I – 350 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$	0,792 ± 0,013	15,1 ± 0,4	2,45 ± 0,17
II – 700 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$	0,771 ± 0,011	12,2 ± 0,6	2,75 ± 0,10
III – 150 $\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$	0,371 ± 0,028	3,3 ± 0,7	1,71 ± 0,23
$NIR_{0,05}$	0,030	0,9	0,26

Dla każdej pary krążków wyciętych z jednego liścia; (jeden krążek w serii K, drugi w serii S), wyliczono względne zmiany wartości parametrów IFL chlorofilu (F_V/F_M, A_M i Rfd) spowodowane podwyższonym napromieniowaniem i oznaczono je jako: $W_N(X) = X_S/X_K$, gdzie: N oznacza grupę roślin I, II lub III, a X_S to wartości poszczególnych parametrów (F_V/F_M, A_M i Rfd) wyznaczone dla krążków liściowych danej grupy, poddanych przez 2 godziny podwyższonemu napromieniowaniu (seria S), natomiast X_K to wartości tych parametrów dla krążków z serii K.

Każdy iloraz określa względną (względem kontroli – K) zmianę wartości danego parametru spowodowaną podwyższonym napromieniowaniem. Dla roślin z grupy I wyliczono: W_I· (F_V/F_M), W_I (A_M) oraz W_I (Rfd). W taki sam sposób obliczono i przedstawiono w postaci diagramów (Rys. 26) względne zmiany parametrów dla roślin z grup II i III. Każdy diagram reprezentuje uśrednioną wartość z 6 powtórzeń. Na podstawie analizy wariancji obliczono najmniejsze istotne różnice (NIR) przy pomocy testu t-Studenta na poziomie istotności 0,05.

roślin z grup I i II. Wartość parametru F_V/F_M wyznaczona dla liści roślin poddanych podwyższonemu napromieniowaniu (z serii **S**) obniżyła się aż o 60% względem wartości wyznaczonej dla krążków liściowych z serii **K**. Niska wartość parametru W_{III} (A_M) wskazuje, że zwiększone napromieniowanie zmniejszyło pulę plastochinonów w liściach roślin tej grupy prawie o połowę.



Rys. 26. Względne wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu (kontrola 1,0) w liściach roślin ogórka rosnących w atmosferze zawierającej: 350 (I), 700 (II) i 150 (III) [$\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$] poddanych działaniu pięciokrotnie podwyższonego promieniowania PAR na zmianę.
Szczegóły w tekście.
Fig. 26. Relative values of chlorophyll fluorescence induction parameters in cucumber leaves growing in atmosphere containing 350 (I), 700 (II), or 150 (III) [$\mu mol(CO_2)\cdot mol^{-1}$] of subjected to five-fold increased PAR. Description in text.

Jeszcze niższa (ok. 0,45) wartość W_{III} (Rfd) informuje, że pod wpływem silnego światła początkowa wartość wskaźnika Rfd obniżyła się, w wartościach bezwzględnych od 1,71 (Tabela 18) do 0,77. Przy wartościach Rfd niższych od 1,0 efektywność fotosyntezy netto pozostaje blisko punktu kompensacyjnego CO_2 [100,122].

W podsumowaniu można stwierdzić, że trwający tydzień niedobór CO_2 wywołał tak duże pogorszenie kondycji fizjologicznej roślin ogórka z III grupy, że zwiększone napromieniowanie PAR już po 2 godzinach wywołało typowe uszkodzenia fotoinhibicyjne.

Wnioski

A. Tygodniowy wzrost badanych roślin ogórka w atmosferze z podwyższonym do 0,0700% stężeniu CO_2 spowodował zmniejszenie ilości akceptorów elektronów w PS II oraz poprawił o kilkanaście procent wartość wskaźnika witalności, w porównaniu z tymi samymi parametrami otrzymanymi dla roślin ogórka uprawianych przy normalnym stężeniu CO_2.
B. Trwający 7 dni wzrost roślin ogórka w atmosferze z obniżonym do 0,0150% stężeniem CO_2 w zdecydowanie niekorzystny sposób wpłynął na przebieg reakcji fazy świetlnej fotosyntezy, o czym świadczą niskie wartości wyznaczonych parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu.
C. Dwugodzinna ekspozycja liści ogórka na 5-krotnie podwyższone natężenie PAR (w stosunku do warunków wzrostu) miała mały wpływ na przebieg reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w roślinach rosnących przy stężeniach 0,0350% i 0,0700% CO_2, natomiast wywołało efekt fotoinhibicji w roślinach rosnących przy poziomie 0,0150% CO_2.
D. Wydaje się celowe i ekonomicznie opłacalne, aby w uprawach szklarniowych kontrolować stężenia CO_2 (z ewentualnym dokarmianiem roślin dwutlenkiem węgla) co nie tylko zapobiegałoby uszkodzeniom fotoinhibicyjnym, ale również umożliwiało pełniejsze wykorzystanie przez rośliny ich potencjalnych zdolności do fotosyntezy.

4.6.3. Reakcja roślin dwóch zróżnicowanych odmian tytoniu Bel-B i Bel-W3 na oddziaływanie zanieczyszczonego powietrza miejskiego

Cel badań

Celem podjętej pracy było zbadanie wpływu zanieczyszczonego powietrza miejskiego na reakcje fazy świetlnej fotosyntezy, wymianę gazową, zawartość chlorofilu, oraz suchą masę liści roślin dwóch odmian tytoniu o zróżnicowanej odporności na stres oksydacyjny.

Materiał i metod

Badano rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) należące do dwóch odmian: Bel-B – tolerancyjnej oraz Bel – W3 wrażliwej na stres oksydacyjny, a szczególnie na działanie ozonu (nasiona obu odmian tytoniu otrzymałem z Instytutu Botaniki PAN w Krakowie) [65,91]. Rośliny tytoniu uprawiano w okresie wiosenno-letnim, w warunkach szklarniowych bez dostępu zanieczyszczonego powietrza miejskiego. Rośliny rosły w pojemnikach z piaskiem podlewane pożywką Hoaglanda (50%). Każdy pojemnik zawierał 6 kg piasku, który utrzymywano w wilgotności ok. 80% pojemności polowej. Po 6 tygodniach część pojemników z roślinami obu odmian umieszczono w miejscu gdzie był zapewniony swobodny dostęp powietrza ulicznego (zanieczyszczonego spalinami samochodowymi) i warunki świetlne podobne jak w szklarni. Po 7 dniach wzrostu w zmienionej atmosferze (ozn. **S**) wykonano pomiary wszystkich założonych wskaźników na liściach roślin obu odmian tytoniu. Takie same pomiary przeprowadzono na liściach roślin obu odmian tytoniu pozostawionych w dotychczasowych warunkach wzrostu (ozn. **K**).

Wykonano następujące pomiary (opisy metod i urządzeń pomiarowych zamieszczono w części 3):

a) fluorescencji chlorofilu (F_V/F_M, Rfd, ETR, Y, qP) przy użyciu fluorymetru PAM 200,
b) zawartości chlorofilu przy użyciu chlorofilometru SPAD-502,
c) fotosyntezy netto (P_N) oraz transpiracji (E) przy użyciu gazoanalizatora LCA-4,
d) aktywności enzymów antyoksydacyjnych,
e) ultrasłabej biochemiluminescencji (UBCL) tkanek liściowych,
f) konduktometryczne (wskaźnik uszkodzeń – k),
g) suchej masy badanych krążków liściowych.

Na liściach roślin serii **K** (nie eksponowanych na zanieczyszczone powietrze miejskie) oznaczono aktywności trzech enzymów o własnościach antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej – SOD, katalazy oraz peroksydazy. Pomiary wykonano przy użyciu spektrofotometru Specord UV-VIS M42 (prod. C. Zeiss, Jena, Niemcy) wg metodyki opisanej w pracy E. Skórskiej [166]. Wyniki przedstawiono w Tabeli 21. Na liściach roślin, w których oznaczano aktywność enzymów antyoksydacyjnych wykonano także pomiary fotosyntezy netto oraz natężenia transpiracji, a następnie określono stopień uszkodzenia błon komórkowych metodą konduktometryczną [część 3.3.] oraz suchą masę badanych dysków liściowych. Wyniki pomiarów przedstawiono w Tabeli 22.

Tabela 19. Uśrednione wartości parametrów fluorescencji chlorofilu, natężenie ultrasłabej biochemiluminescencji oraz zawartość chlorofilu w liściach dwóch odmian tytoniu: Bel-B i Bel-W3 nie poddanych działaniu zanieczyszczonego powietrza miejskiego

Table 19. Average values of chlorophyll fluorescence parameters, intensity of ultraweak biochemiluminescence and chlorophyll content in leaves of two tobacco cultivars: Bel-B and Bel-W3, not subjected to polluted urban air

Cechy	Bel-B	Bel-W3	$NIR_{0,05}$
F_V/F_M	0,796 ± 0,018	0,786 ± 0,021	br
Rfd	2,15 ± 0,15	1,96 ± 0,21	br
ETR	31,1 ± 0,7	30,6 ± 0,8	br
Y	0,617 ± 0,014	0,607 ± 0,016	br
qP	0,822 ± 0,031	0,815 ± 0,020	br
UBCL	27,3 ± 3,7	26,6 ± 4,2	br
Chl [SPAD]	21,2 ± 1,2	20,5 ± 1,1	br

Tabela 20. Uśrednione wartości parametrów fluorescencji chlorofilu, natężenie ultrasłabej biochemiluminescencji oraz zawartość chlorofilu w liściach dwóch odmian tytoniu: Bel-B i Bel-W3 poddanych przez 7 dni działaniu zanieczyszczonego powietrza miejskiego

Table 20. Average values of chlorophyll fluorescence parameters, intensity of ultraweak biochemiluminescence and chlorophyll content in leaves of two tobacco cultivars: Bel-B and Bel-W3, subjected to polluted urban air for 7 days

Cechy	Bel-B	Bel-W3	$NIR_{0,05}$
F_V/F_M	0,769 ± 0,020	0,767 ± 0,018	Br
Rfd	1,54 ± 0,04	1,23 ± 0,06	0,12
ETR	26,9 ± 1,7	22,8 ± 1,1	1,8
Y	0,534 ± 0,033	0,451 ± 0,021	0,034
qP	0,732 ± 0,034	0,615 ± 0,038	0,058
UBCL	142 ± 20	199 ± 27	50,0
Chl [SPAD]	22,6 ± 1,2	17,0 ± 1,6	1,1

Tabela 21. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oznaczonych w liściach roślin tytoniu odm. Bel-B i Bel-W3

Table 21. Activity of antioxidant enzymes found in tobacco leaves of cvs. Bel-B and Bel-W3

Cecha	Bel-B		Bel-W3
Aktywność SOD [$U \cdot g^{-1}$]	115 ± 17		104 ± 22
$NIR_{0,05}$		br	
Aktywność katalazy [$kU \cdot g^{-1}$]	34 ± 5		40 ± 7
$NIR_{0,05}$		br	
Aktywność peroksydazy [$U \cdot g^{-1}$]	557 ± 51		402 ± 24
$NIR_{0,05}$		52	

Dyskusja wyników

Z danych w Tabeli 19 wynika, że w warunkach **K** rośliny wrażliwej odmiany Bel-W3 wykazują nieco niższe wartości wszystkich oznaczonych cech w porównaniu z analogicznymi cechami u odmiany tolerancyjnej Bel-B, jednak różnice te nie są istotne na poziomie $p<0,05$. Podobieństwo tych samych dwóch genotypów tytoniu potwierdzają rezultaty wcześniejszych badań [166], z których wynikało, że w warunkach kontrolnych rośliny odm. Bel-B i odm. Bel-W3 nie różniły się pod względem cech biometrycznych, intensywności fotosyntezy netto i transpiracji.

Pod wpływem zanieczyszczonego spalinami samochodowymi powietrza (Tabela 20) wartości wszystkich wyznaczonych cech związanych z fotosyntezą, uległy obniżeniu w roślinach obu badanych odmian tytoniu. W tych grupach roślin (**S**) wyznaczone wartości parametrów dla odm. Bel-W3 są istotnie niższe (z wyjątkiem F_V/F_M) od wartości tych samych parametrów wyznaczonych dla odmiany tolerancyjnej Bel-B. Największa różnica (bo ponad 20%) dzieli wartość wskaźnika witalności wyznaczonego dla roślin odm. Bel-B od wartości wskaźnika Rfd otrzymanych dla odm. Bel-W3.

Jednostką aktywności katalazy [1 $kU \cdot g^{-1}$] jest taka aktywność enzymu, która katalizuje rozkład $1 \cdot 10^{-3}$ mol H_2O_2 w ciągu 1 min. w 25°C i pH 7, w przeliczeniu na 1 g suchej masy liścia. Jednostką aktywności peroksydazy [1 $U \cdot g^{-1}$] jest taka aktywność enzymu, która katalizuje rozkład $1 \cdot 10^{-6}$ mol H_2O_2 w ciągu 1 min. w 25°C i pH 7, w przeliczeniu na 1 g suchej masy liścia. Jednostką aktywności SOD [1 $U \cdot g^{-1}$] jest taka aktywność enzymu, która w 50% inhibituje szybkość redukcji cytochromu c w 25°C i pH 7, w przeliczeniu na 1 g suchej masy liścia.

Pomiary fotosyntezy netto P_N oraz intensywności transpiracji E w liściach grupy S wskazują na znaczną inhibicję obu tak ważnych dla roślin procesów fizjologicznych w roślinach wrażliwej odmiany tytoniu (Tabela 22). Niższa aż o 69% wydajność fotosyntezy P_N u roślin odm. Bel-W3 świadczy, że przyczyną tego była, nie tylko mniejsza (o kilkanaście procent) efektywność reakcji fazy świetlnej, ale nastąpiła również inhibicja reakcji enzymatycznych w fazie ciemnej [6]. Konsekwencją obniżonej produktywności fotosyntetycznej jest mniejsza o 35% sucha masa dysków z liści odm. Bel-W3, w porównaniu z suchą masą dysków otrzymanych z liści odmiany tolerancyjnej (Tabela 22).

Tabela 22. Natężenie fotosyntezy netto (P_N) oraz transpiracji (E), wskaźnik uszkodzeń błon komórkowych (k) i sucha masa (s.m.) blaszek liściowych roślin tytoniu odm. Bel-B i Bel-W3 poddanych przez 7 dni na działanie zanieczyszczonego powietrza miejskiego

Table 22. Intensity of net photosynthesis (P_N) and transpiration (E), index of cellular membrane damages (k) and dry matter (s.m.) of tobacco leaves of cvs. Bel-B and Bel-W3, subjected to polluted urban air for 7 days

Odmiany	P_N	E	$k \cdot 10^3$	s.m. [$mg \cdot cm^{-2}$]
Bel-B	6,94 ± 0,52	2,20 ± 0,13	10,6 ± 3,1	28,2 ± 4,9
Bel-W3	2,16 ± 0,31	1,40 ± 0,50	49,8 ± 8,0	18,2 ± 3,3
$NIR_{0,05}$	0,51	0,47	8,1	2,0

Przy porównaniu roślin z grup K i S (Tabele 19 i 20) uwagę zwraca bardzo znaczny wzrost emisji UBCL (ok. pięciokrotny u roślin Bel-B i aż 7,5-krotny u roślin wrażliwej odm. Bel-W3), co świadczy o znacznie spotęgowanej peroksydacji (nadtlenkowego utleniania) lipidów w błonach komórkowych wywołanej przez RFT. Wyższy o ok. 50% poziom emisji UBCL z liści wrażliwej odmiany tytoniu świadczy o mniejszej aktywności układu przeciwutleniającego [część 2.2.4.]. Potwierdzeniem takiego wniosku mogą być wyniki pomiarów aktywności enzymów antyoksydacyjnych (Tabela 21), które wskazują na niższą, o ok. 38% aktywność peroksydazy w tkankach liści tytoniu odm. Bel-W3.

Wzmożona emisja UBCL z tkanek liści odmiany Bel-W3 wskazuje również na zaawansowany proces degradacji biomembran komórkowych czego dowodem jest prawie 5-krotnie wyższy, w porównaniu z roślinami Bel-B, wskaźnik uszkodzeń struktur komórkowych – $k \cdot 10^3$ wyznaczony metodą konduktometryczną (Tabela 22).

Z porównania zawartości chlorofilu w liściach roślin z grup K i S (Tabele 19 i 20) wynika, że warunki stresowe nie spowodowały w liściach Bel-B fotodegradacji tego barwnika, natomiast znacząco obniżyły jego zawartość w liściach tytoniu odm. Bel-W3. Efekt ten może częściowo wyjaśniać przyczynę powstawania plamek nekrozowych na liściach wrażliwej odmiany tytoniu (Fot. 2).

W celu zobiektywizowania oceny stopnia zanieczyszczenia powietrza fitotoksycznymi gazami o działaniu oksydacyjnym (głównie ozonem i tlenkami azotu), dodatkowo określono uszkodzenia blaszek liściowych badanych odmian tytoniu przy pomocy metody wizualnej. Przebarwienia i nekrozy występujące na liściach obu odmian tytoniu nie były brane pod uwagę, gdyż mogły być spowodowane czynnikami nawozowymi, uszkodzeniami przez owady lub przez patogeny. Najczęściej stosowaną metodą jest wizualna ocena stopnia pokrycia powierzchni liścia nekrotycznymi plamami i porównanie z typowymi obrazami uszkodzonych liści na fotografiach lub planszach. Stopień uszkodzenia określa się zwykle w siedmiostopniowej skali procentowego pokrycia blaszki liściowej plamkami nekrozowymi: 0%, 1-4%, 5-10%, 11-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100% [52]. Ocenę tego biotestu można zobiektyzować posługując się metodą fotograficzną lub kamerą TV przyłączoną do komputera [65].

W pracy posłużono się porównawczą oceną uszkodzeń liści wrażliwej odm. tytoniu, wykorzystując metodykę i plansze otrzymane z Instytucie Botaniki im. W. Szafera, PAN w Krakowie. Makrofotografie liści wykonano cyfrowym aparatem fotograficznym Casio 5000 SX (rozdzielczość 1280 x 960). Na fotografii 2A przedstawiono typowy obraz liścia odm. Bel-B (lewa strona) oraz liścia należącego do rośliny tytoniu odm. Bel-W3 (na prawej stronie) z grupy roślin nie poddanych działaniu gazów oksydacyjnych – K. Na fotografii 2B znajdują się zdjęcia liści należących do tych samych odmian, ale poddanych przez 7 dni działaniu zanieczyszczonego spalinami powietrza ulicznego – S. Liście należące do odm. Bel-B były „czyste" ponieważ zanieczyszczenie powietrza nie było zbyt duże, natomiast na liściach tytoniu odm. Bel-W3 pojawiły się nekrozy. Według oceny bonitacyjnej udział powierzchni nekroz pokrywających piąty liść roślin tytoniu odm. Bel-W3 wynosił ok. 5 ÷ 6% całej powierzchni blaszki liściowej, co odpowiada trzeciemu stopniowi uszkodzeń (w siedmiostopniowej skali).

Fot. 2. Liście roślin tytoniu odm. Bel B (tolerancyjnej) i odm. Bel W3 (wrażliwej na ozon) nie poddane działaniu zanieczyszczonego powietrza miejskiego - rząd górny A, i liście tych samych odmian tytoniu poddane przez 7 dni działaniu powietrza zanieczyszczonego spalinami samochodowymi. Objaśnienia w tekście 3.6.3.

Photo. 2. Tobacco leaves of cv. Bel B (tolerant) and cv. Bel W3 (sensitive to ozone) not-subjected to polluted urban air - upper row A, and leaves of the same cultivars subjected to combustion gases polluted air for 7 days. Details in Chapter 3.6.3.

Wnioski

A. Zanieczyszczone spalinami powietrze negatywnie wpłynęło na przebieg indukcji fluorescencji chlorofilu, na intensywność fotosyntezy netto, stabilność błon biologicznych, przyrost biomasy oraz zawartość chlorofilu w liściach roślin wrażliwej odmiany tytoniu Bel-W3, a w mniejszym stopniu także i na rośliny bardziej odpornej odmiany Bel-B.

B. Szkodliwe efekty oddziaływania powietrza miejskiego w porze letniej ujawniły się także wizualnie powodując powstanie na blaszkach liściowych roślin wrażliwej odmiany tytoniu Bel-W3 plamek nekrozowych (III stopień uszkodzeń nekrozowych w skali 7 stopniowej).

C. Przyjmując za poziom odniesienia (100%) wartości parametrów wyznaczone dla roślin tolerancyjnej odm. Bel-B po ekspozycji na powietrze miejskie, stwierdzono w liściach odmiany wrażliwej Bel-W3 prawie 5-krotnie wyższą wartość wskaźnika uszkodzeń błon komórkowych, spadek intensywności fotosyntezy netto o ok. 70% oraz zmniejszeniu suchej masy dysków liściowych o ok. 36%.

D. Zakres i stopień zakłóceń funkcji fizjologicznych oraz uszkodzeń strukturalnych w tkankach liści tytoniu odm. Bel W3 wywołane kilkudniową ich ekspozycją na zanieczyszczone spalinami powietrze miejskie wskazują na zaistnienie stresu oksydacyjnego.

E. Do bardziej wnikliwej oceny efektów stresu oksydacyjnego, zwłaszcza przy niezbyt dużym jego nasileniu bardziej przydatne od wizualnych są inne, wykorzystane w pracy metody badawczo-diagnostyczne (np. fluorescencyjna, chemiluminescencyjna, gazometryczna, konduktometryczna).

F. W pracach badawczych i hodowlanych prowadzonych na obszarach zurbanizowanych w okresie wiosenno – letnim należałoby zwrócić szczególną uwagę na możliwość zaistnienia stresu oksydacyjnego (przy nieuniknionej obecności w powietrzu wolnorodnikowych utleniaczy pochodzenia antropogenicznego np. ozonu, NO_X, SO_2), który może zakłócić proces fotosyntezy i pogorszyć stan fizjologiczny badanych roślin.

G. Wzrastające zagrożenie dla wegetacji roślin (zwłaszcza dla procesu fotosyntezy) spowodowane stresem oksydacyjnym, który często połączony jest z innymi niekorzystnymi czynnikami środowiska, wymaga zastosowania nowych, (np. fluorescencyjnych, teledetekcyjnych) metod monitorowania stanów stresowych w uprawach rolniczych i na obszarach leśnych.

5. DYSKUSJA I PODSUMOWANIE

Celem rozprawy było zbadanie **metodami luminescencyjnymi** reakcji wybranych roślin uprawnych na oddziaływanie niektórych czynników stresowych. W badaniach wykorzystywano zjawiska: fluorescencji chlorofilu (**FL**) i opóźnionej luminescencji (**OL**) chlorofilu oraz ultrasłabej biochemiluminescencji tkanek roślinnych (**UBCL**). Szczególną uwagę zwrócono na wykazanie przydatności zastosowanych metod w rozwiązywaniu problemów związanych z ekofizjologią i ochroną roślin uprawnych oraz korzyści z ich zastosowania w praktyce rolniczej i ogrodniczej. Przykłady szczegółowych zadań badawczych związanych z oddziaływaniem różnych czynników stresowych na rośliny zgrupowano w 6 częściach tematycznych: **chłód i światło, podwyższona temperatura, deficyt wody, niedobór azotu, herbicydy – inhibitory fotosyntezy** oraz **stres oksydacyjny**.

Badania dotyczyły w głównej mierze oceny tolerancji odmianowej roślin uprawnych uwarunkowanej genetycznie lub nabytej w wyniku aklimatyzacji. Badaniom poddano 10 gatunków roślin (kukurydza, pszenica, jęczmień, burak, rzepak, tytoń, fasola, ogórek, pomidor, komosa), należących do 14 odmian, a także roślin należących do dwóch rodów rzepaku triazynoodpornego.

Z przytoczonych rezultatów badań oraz z przeglądu literatury wynika, że wiele czynników stresowych zakłóca reakcje fotosyntezy, co znajduje odzwierciedlenie w luminescencji chlorofilu zlokalizowanego w liściach badanych roślin. Od kilku lat także i w Polsce zaczynają upowszechniać się metody fluorescencyjne: indukcja fluorescencji (**IFL**) oraz analiza wygaszania impulsów FL chlorofilu (**PAM**).

Do wyznaczania parametrów FL chlorofilu wykorzystywano trzy urządzenia pomiarowe własnej konstrukcji oraz profesjonalny fluorymetr impulsowy PAM 200 (prod. Walz, Niemcy), natomiast do rejestracji OL chlorofilu oraz UBCL tkanek roślinnych zostały wykorzystane wysokoczułe zestawy kwantometryczne (własnej konstrukcji). Uzupełniające pomiary wymiany gazowej i transpiracji wykonywano przy użyciu analizatora LCA-4 (prod. ADC, W. Brytania), a zawartość chlorofilu mierzono przy użyciu aparatu SPAD-502 (prod. Minolta, Japonia). Opisy wymienionych zestawów i urządzeń pomiarowych oraz stosowane metody badawcze zostały wydzielone w metodycznej części pracy.

Szczególną uwagę zwrócono na mniej znane metody luminescencyjne: pomiary OL chlorofilu, rejestracja termogramów FL chlorofilu i detekcja UBCL. Metody te nie były dotąd szerzej stosowane w naszym kraju, a mogą spełniać ważną rolę w badaniach reakcji fotosyntezy oraz dostarczać informacji przydatnych do integralnej oceny stanu fizjologicznego roślin w warunkach stresowych.

W badaniach reakcji roślin na czynniki stresowe najczęściej wyznaczano parametry przedstawiające:

F_0 - fluorescencję zerową, straty energii wzbudzenia podczas jej przekazywania z anten energetycznych do centrum reakcji PS II,

F_V/F_M - maksymalną efektywność reakcji fotochemicznej w PS II,

A_M - wielkość puli niezredukowanych akceptorów elektronów w PS II,

qP - wygaszanie fluorescencji chlorofilu na drodze fotochemicznej,

Rfd - współdziałanie reakcji fazy świetlnej z enzymatycznymi reakcjami fazy ciemnej, miernik potencjalnej aktywności fotosyntetycznej chloroplastów – **wskaźnik witalności**,

Y - maksymalną wydajność konwersji energii fotonów PAR na energię chemiczną w danych warunkach świetlnych,

L_D - sprawność transportu elektronów w PS II,

T_P, T_M - odpowiednio: temperaturę progową i maksymalną, odczytane z termogramów F_0 informujących o termowrażliwości struktur barwnikowo-białkowych (LHC, LHC II, LHC I), określanych jako **anteny energetyczne**.

Chłód, a w większym jeszcze stopniu **chłód połączony z silnym światłem**, należą do ważniejszych czynników stresowych ograniczających rozwój i plonowanie szeregu roślin ogrodniczych oraz niektórych rolniczych (np. kukurydzy).

Badano wpływ dwugodzinnego okresu chłodu (4°C) na zmianę wartości parametrów F_V/F_M, Y i Rfd wyznaczonych dla roślin pomidora należących do odmiany wczesnej, gruntowej (Promyk) oraz szklarniowej (Robin), a następnie wpływ takiego samego chłodu wraz z podwyższonym ok. pięciokrotnie (w stosunku do warunków wzrostu) natężeniem PAR. Stwierdzono, że w warunkach chłodu połączonego ze zwiększonym promieniowaniem PAR wartości tych samych parametrów obniżyły się znacznie bardziej. W obu wariantach doświadczenia czynniki stresowe w istotnie większym stopniu zakłóciły reakcje fazy świetlnej fotosyntezy w liściach roślin odm. Robin (w porównaniu z odm. Promyk).

Po pomiarach IFL chlorofilu fragmenty liści obu odmian pomidora (zarówno poddanych oddziaływaniu czynników stresowych, jak i z serii kontrolnych, pozostających w warunkach wzrostu) odłożono na okres jednodobowej restytucji w temperaturze pokojowej i w ciemności. Następnie powtórzono pomiary IFL chlorofilu, a ich wyniki potwierdziły większą tolerancję aparatu fotosyntetycznego roślin odm. Promyk w porównaniu z odm. Robin zarówno na chłód, jak i na chłód połączony z silnym napromieniowaniem. Jednoczesne oddziaływanie tych dwóch czynników stresowych wywołało jednak tak duże zakłócenia w przebiegu reakcji fazy świetlnej fotosyntezy, że wewnątrzkomórkowe procesy naprawcze,

nawet w liściach bardziej tolerancyjnej odm. Promyk nie zdołały przywrócić początkowej wydajności reakcji fotosyntezy. Zaznaczyła się także charakterystyczna dysproporcja w spadku wartości parametrów związanych z przebiegiem reakcji fazy świetlnej w PS II (F_V/F_M i Y o ok. 45%) i obniżeniu wartości Rfd (aż o 67%). Podobną prawidłowość zarejestrowano po restytucji badanych fragmentów liści należących do odm. Robin, jednakże w tym przypadku wartości F_V/F_M oraz Y obniżyły się o ok. 60%, natomiast wskaźnik witalności - Rfd aż o 80%. Tak znaczne i utrwalone zakłócenie reakcji fotosyntezy świadczy o poważnych uszkodzeniach natury fotoinhibicyjnej, które nastąpiły w roślinach tej odmiany pomidora.

Warto zaznaczyć, że pomiary kontrolne (w warunkach „bezstresowych") wykazywały istotnie wyższe wartości wyznaczanych parametrów w liściach odm. Robin, co wskazuje na jej potencjalnie większą (w odniesieniu do odm. Promyk) aktywność fotosyntetyczną. Na podstawie uzyskanych wyników badań można założyć, że w warunkach polowej uprawy bardziej celowy byłby wybór odmian pomidora reagujących na niekorzystne czynniki środowiska podobnie jak odm. Promyk. W warunkach uprawy szklarniowej lub w tunelach foliowych warto rozważyć celowość uprawy odmian pomidora o wyższej aktywności fotosyntetycznej (podobnej do odm. Robin), które w optymalnych warunkach uprawy mogą wykazywać wyższą produktywność.

Do podobnych wniosków można dojść po analizie wyników pomiarów IFL chlorofilu w liściach ogórka należących do tradycyjnej odm. Wisconsin oraz liściach mieszańca Aladyn F1. W warunkach „bezstresowych" wartości parametrów F_V/F_M i A_M wyznaczane u obu odmian nie różniły się w stopniu istotnym, co świadczy o podobnej sprawności reakcji fotochemicznej i zasobach puli akceptorowej w PS II, natomiast wartości wskaźnika witalności Rfd były istotnie wyższe w liściach roślin mieszańca Aladyn F1.

Po poddaniu liści obu odmian kilkugodzinnemu oddziaływaniu obniżonej temperatury (4°C), przy ok. pięciokrotnie podwyższonym (w stosunku do warunków wzrostu) natężeniu PAR, nastąpiły radykalne zmiany w przebiegu reakcji fazy świetlnej fotosyntezy. Pomiary IFL wykonywane po 2, 4 i 6 godzinach wykazały stopniowe obniżanie się wartości parametrów F_V/F_M i A_M, przy czym większy spadek ujawnił się u roślin należących do mieszańca. Już po 2 godzinach działania czynników stresowych wartości tych parametrów w liściach należących do Aladyna F1 obniżyły się o ponad 50%, podczas gdy w liściach ogórka odm. Wisconsin o ok. 40%. Znacznie bardziej obniżyły się wartości Rfd (odpowiednio o 89% i o 80%). Pomiary wykonane po 4 i 6 godzi-

nach wykazały, że u roślin obu odmian wartości Rfd zmalały do ok. 10%, co świadczy o bardzo niskiej potencjalnej zdolności chloroplastów do fotosyntezy. Uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach chłodu niskotemperaturowa inhibicja reakcji enzymatycznych fazy ciemnej fotosyntezy wyprzedza stopniowo pogłębiającą się dysfunkcję PS II.

Problem wrażliwości roślin na **podwyższoną temperaturę** staje się obecnie coraz bardziej aktualny i dotyczy szczególnie roślin uprawianych pod osłonami. Badaniom poddano rośliny pomidora typowej odmiany szklarniowej Robin oraz rośliny pomidora należące do odmiany termowrażliwej Roma. W warunkach „bezstresowych" wartości parametrów IFL chlorofilu (F_V/F_M, A_M i Rfd) w liściach roślin obu odmian były zbliżone, co świadczy o ich podobnej, potencjalnej aktywności fotosyntetycznej. Wyznaczając te same parametry przy podwyższonej do 38°C temperaturze blaszek liściowych stwierdzono obniżenie wszystkich ich wartości, przy czym spadki te u roślin odm. Roma były z reguły istotnie większe. Wartości F_V/F_M i A_M, zmalały odpowiednio o 50% i o 64% w liściach odm. Robin i aż o 81% i 93% w liściach odm. Roma. Wartości Rfd obniżyły się natomiast w mniejszym stopniu, bo tylko o 36% i 51% (odpow. dla odm. Robin i Roma) można więc uważać, że podwyższona temperatura zakłóciła w głównej mierze przebieg reakcji w fazie świetlnej fotosyntezy.

Ważną rolę przystosowawczą do zmieniających się warunków termicznych może spełniać **proces aklimatyzacji** (hartowania). Część roślin obu badanych odmian z poprzedniego eksperymentu przez 3 doby hartowano w temperaturze powietrza 38°C (rzeczywista temp. tkanek liściowych w wyniku transpiracji była o 2÷3°C niższa!), a następnie wyznaczono i porównano termogramy FL chlorofilu w liściach roślin hartowanych oraz kontrolnych. Z otrzymanych termogramów (tzn. rejestracji zmian wydajności F_0 przy podgrzewaniu krążków liściowych od 30°C do 60°C) można odczytać temperaturę progową T_P, która sygnalizuje początek termicznej destrukcji anten energetycznych w PS II. Sprawne funkcjonowanie tych kompleksów, pełniących rolę specyficznych „anten" wychwytujących fotony promieniowania PAR, jest koniecznym warunkiem zapoczątkowania procesu fotosyntezy. W niehartowanych liściach obu odmian wartości T_P były zbliżone, natomiast po 3 dobach hartowania nastąpił znaczny wzrost średniej temperatury progowej w liściach pomidora odm. Robin (o ok. 5°C), przy wzroście tylko o 1°C u odm. Roma. Można przypuścić, że właśnie brak genetycznie uwarunkowanej zdolności roślin odm. Roma do podwyższania termostabilności struktur aparatu fotosyntetycznego należy do głównych przyczyn ich niskiej odporności na podwyższoną temperaturę.

Ważny wkład do zrozumienia mechanizmów termowrażliwości dostarczyły wyniki badań reakcji roślin rzepaku posiadającego prawidłowy genotyp oraz rzepaku triazynoodpornego (**TR**), w którym wystąpiła mutacja genu chloroplastowego **psb A** kodującego białko **D1** (32 kDa). Białko to pełni kluczową rolę w PS II kontrolując fotosyntetyczny transport elektronów (**FTE**) pomiędzy plastochinonowymi akceptorami PQ_A i PQ_B. W wyniku mutacji struktura białka D1 zmieniła się w taki sposób, że utrudnione zostało przyłączenie do niego cząsteczek herbicydów triazynowych (atrazyny, symazyny i in.), ale niestety także w istotnej mierze spowolniony został FTE w PS II. Utrudniony przepływ elektronów obniża efektywność fotofosforylacji niecyklicznej oraz uwrażliwia aparat fotosyntetyczny na uszkodzenia **fotoinhibicyjne**. Badaniom porównawczym poddano liście roślin rzepaku należących do TR rodu 7841/1i/99 (otrzymane z IHAR w Poznaniu) oraz popularnej odmiany rzepaku Marita. W warunkach „bezstresowych" wyznaczono parametry IFL chlorofilu (F_0, F_V/F_M, A_M i Rfd) oraz OL chlorofilu (L_D). Wartości parametru F_V/F_M wyznaczone dla roślin rzepaku z chloroplastową mutacją były o 11% niższe, a Rfd aż o 38% niższe od wartości tych samych parametrów wyznaczonych dla roślin rzepaku z prawidłowym genomem (odm. Marita). Średnia wartość F_0 wyznaczona dla roślin rodu TR była o ponad 31% wyższa w porównaniu z wartością F_0 wyznaczonej dla Marity, co świadczy o wpływie mutacji na wzrost strat energii wzbudzenia podczas jej przekazywania z obszaru anten energetycznych do centrum reakcji PS II.

Wykonane pomiary zaniku OL chlorofilu wykazały aż 15-krotnie niższą wartość parametru L_D wyznaczoną dla roślin rodu TR (w porównaniu z odm. Marita), co wskazuje na znaczne zakłócenie w FTE.

Zarejestrowano również i porównano termogramy fluorescencji F_0 (w taki sam sposób jak poprzednio dla roślin pomidora) liści obu genotypów rzepaku. Odczytana z termogramów temperatura progowa T_P dla rodu 7841/1i/99 była o 4°C niższa od T_P wyznaczonej dla liści Marity.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że tolerancja roślin na podwyższoną temperaturę jest w dużej mierze uzależniona od stabilności struktur aparatu fotosyntetycznego oraz efektywnego przebiegu reakcji fazy świetlnej w warunkach działania tego czynnika stresowego. Ważną rolę ochronną spełnia zarówno zdolność do przebudowy struktur białkowych, jak i do modyfikacji funkcji komórkowych zachodzących podczas procesu hartowania. Brak zdolności roślin do hartowania (aklimatyzacji) zwiększa w znacznym stopniu ich termowrażliwość.

Niedobór wody w uprawach rolniczych, również i w naszym kraju stał się ważnym czynnikiem stresowym, a według prognozowanych zmian klimatu, problem ten będzie narastał. Dużą rolę w ograniczaniu skutków suszy mogą spełnić odmiany roślin uprawnych, które nie tylko potrafią unikać odwodnienia, ale w warunkach deficytu wody będą zdolne do utrzymywania aktywności fizjologicznej oraz efektywnej fotosyntezy. Badania przeprowadzono na dwóch odmianach pszenicy: Odesska 51 (bardziej tolerancyjna) i Bezostna (wrażliwa na suszę) oraz dwóch odmianach jęczmienia: Gryf (bardziej tolerancyjna) i Aramir (wrażliwa na suszę). Rośliny uprawiano w warunkach kontrolowanych w termoluminostatach. Badania przeprowadzano na fragmentach drugiego liścia. Każdy liść dzielono na część kontrolną (owiniętą w wilgotną bibułę) oraz część suszoną. W drugim wariancie suszenie powietrzne zostało zastąpione 3 godzinną dehydratacją blaszek liściowych przez 1,5 molowy roztwór sacharozy. Następnie mierzono OL chlorofilu w obu fragmentach i obliczano względne (względem kontroli) obniżenie wartości składowej dekasekundowej (N_D). Średnia wartość tego parametru wyznaczona dla wrażliwej odm. pszenicy (suszonej powietrznie do ok. 38% pierwotnej masy) była ponad 5 razy niższa od wartości N_D wyznaczonej (przy takim samym odwodnieniu) dla liści odm. Odesska 51. Odwodnione na roztworze sacharozy fragmenty liści wrażliwej odm. jęczmienia wykazywały prawie 4-krotnie niższą wartość N_D od wartości tego parametru wyznaczonego dla liści odpornej odm. Gryf. Emisja OL w zakresie od 14 s do 20 s jest spowodowana promienistą rekombinacją ładunków: PQ_B^- (na stronie akceptorowej PS II) z S_2^+ w kompleksie rozkładu wody. Parametr N_D jest **czułym wskaźnikiem odwodnienia** komórki roślinnej, a jego pomiar łatwy i szybki (czas pomiaru serii 6 próbek ok. 6 min.).

Badano również zmiany FL chlorofilu w krążkach liści rzepaku, które suszono powietrznie do niskiej wartości RWC (ok. 16%), a następnie poddawano przez 24 godziny restytucji. Pomiary wykonywano przy użyciu fluorymetru PAM 200 i wyznaczano: F_0, F_V/F_M, F_V/F_0, qP, Y oraz Rfd. W wyniku suszy wartość F_0 (straty energii wzbudzenia w antenie energetycznej) wzrosła o 42%, a wartość parametru F_V/F_M (miara efektywności reakcji fotochemicznej w PS II) zmniejszyła się o 31%. Jeszcze bardziej zmalała wartość parametru F_V/F_0 (aż o 66%), co świadczy o znacznej inhibicji reakcji w kompleksie rozkładu wody na donorowej części PS II. Prawie o 90% zmalały wartości qP i Y, co wskazuje na drastyczny spadek wydajności reakcji w fazie świetlnej fotosyntezy. Wartość wskaźnika Rfd zmalała aż o 93%, co świadczy o zaniku potencjalnej zdolności chloroplastów rzepaku do fotosyntezy.

Po jednodobowej restytucji (pełne uwodnienie tkanek) znaczna poprawa nastąpiła w wartościach F_V/F_0 i qP, które osiągnęły odpowiednio 55% i 84% wartości w próbkach kontrolnych. Natomiast niewielką poprawę wykazał wskaźnik Rfd, osiągając zaledwie 35% wartości kontroli. Taka utrwalona dysproporcja pomiędzy dość wysokimi wartościami parametrów charakteryzujących efektywność reakcji fazy świetlnej i niską wartością wskaźnika witalności może świadczyć o daleko posuniętej inhibicji reakcji enzymatycznych w ciemnej fazie fotosyntezy.

Przeprowadzone badania wpływu silnego odwodnienia tkanek liści na przebieg reakcji fotosyntezy przy wykorzystaniu OL oraz IFL chlorofilu wykazały, że dehydratacja najsilniej zakłóca funkcje kompleksu rozkładu wody oraz reakcje w fazie ciemnej fotosyntezy.

Na roślinach tej samej odmiany rzepaku przeprowadzono badania wpływu egzogennie wprowadzonej **spermidyny** (20 h pasywnej infiltracji 10 mM roztworem spermidyny) na FL chlorofilu w krążkach liści w pełni uwodnionych (kontrolne) oraz poddanych silnemu odwodnieniu, aż do utraty 84% wody. Pomiary wykonywano fluorymetrem PAM 200 i wyznaczano: F_V/F_M, F_V/F_0, qP, Y oraz Rfd. Dla każdego parametru obliczono względne (względem kontroli) zmiany jego wartości spowodowane odwodnieniem. Następnie krążki wcześniej suszone poddano jednodobowej restytucji i obliczono względne (względem kontroli) zmiany wartości poszczególnych parametrów. Takie same pomiary oraz obliczenia zmian wartości parametrów pod wpływem suszy (również do utraty 84% wody), a następnie poddanych restytucji, wykonano na krążkach liści nie infiltrowanych roztworem spermidyny.

Porównując względne zmiany wartości parametrów FL chlorofilu w odwodnionych fragmentach liści infiltrowanych roztworem spermidyny oraz bez egzogennej spermidyny można stwierdzić, że w pierwszym przypadku wartości wszystkich badanych parametrów obniżyły się w stopniu dużo mniejszym. Świadczy to o bardzo **korzystnym wpływie spermidyny**, która nawet przy tak znacznej utracie wody w komórkach ochroniła w znacznym stopniu funkcjonalną zdolność chloroplastów do fotosyntezy. Po procesie restytucji względne wartości parametrów wyznaczonych dla liści wzbogaconych w spermidynę wzrosły jeszcze bardziej, zbliżając się do poziomu kontroli (od 84% do 95%) z wyjątkiem Rfd, który osiągnął tylko 65% wartości kontroli. Uzyskane wyniki potwierdzają rezultaty wcześniejszych prac świadczących o ochronnym wpływie spermidyny (podczas działania czynników stresowych) na przebieg reakcji fazy świetlnej fotosyntezy i w nieco mniejszym stopniu na przebieg reakcji ciemniowych.

Nie podlega dyskusji kluczowa rola **azotu** jako makroelementu niezbędnego dla roślin, natomiast mniejszą uwagę zwracano dotąd na odpowiednie zaopatrzenie ich w **siarkę**, także ważny składnik nawozowy. Do końca dekady lat osiemdziesiątych problemem w Polsce (podobnie jak i w innych krajach Europy środkowej) był nadmiar związków siarki w glebach i wodach powierzchniowych wywołany przez tzw. kwaśne opady, będące w głównej mierze efektem zanieczyszczenia powietrza przez zakłady przemysłowe, energetyczne oraz emisje komunalne. Znaczny postęp technologiczny w dziedzinie oczyszczania spalin przemysłowych, a także zwiększone wymagania dotyczące ochrony środowiska spowodowały, najpierw w Europie zachodniej, a od ok. 10 lat również i w Polsce, sukcesywne ograniczanie imisji związków siarki. Zmieniona sytuacja wymaga **uzupełniającego nawożenia siarkowego**, szczególnie przy uprawie roślin wymagających zwiększonego zasilania w siarkę (jak rzepaku i innych z rodzaju krzyżowych) oraz roślin wysokoproduktywnych, jak np. kukurydzy.

Przeprowadzono badania wpływu zróżnicowanych dawek azotu bez siarki oraz takich samych dawek azotu wraz z siarką (w preparatach azotanu i siarczanu amonu) na wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu, określających efektywność reakcji świetlnych fotosyntezy, a także oddziaływanie tych pierwiastków na zawartość chlorofilu i rozwój liści rzepaku ozimego.

Zastosowanie obniżonych dawek azotu bez siarki (25% i 50% dawki optymalnej; w formie azotanu amonu) i takich samych dawek azotu wraz z siarką (w formie siarczanu amonu) w znacznym stopniu zahamowało wzrost i rozwój liści, zmniejszyło zawartość chlorofilu, ale tylko w niewielkim stopniu pogorszyło efektywność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w badanych roślinach rzepaku.

Przy najniższej dawce azotu (0,38 gN/pojemnik) powierzchnia liści zmniejszyła się o ok. 85%, a sucha masa liści o ok. 87% w odniesieniu do wariantu optymalnego, bez istotnej różnicy między nawożeniem azotanem lub siarczanem amonu. Przy tak samo obniżonej dawce spadek zawartości chlorofilu był o ok. 45%, gdy stosowano azotan amonu (sam N) i tylko o ok. 30%, gdy zastosowano siarczan amonu (N + S).

W jeszcze mniejszym stopniu zakłócone zostały reakcje fazy świetlnej fotosyntezy, których efektywność oceniano analizując wartości parametrów IFL chlorofilu. Przykładem może służyć zmiana wartości parametru F_V/F_M, który określa maksymalną efektywność reakcji fotochemicznej w PS II. Przy czterokrotnie obniżonej dawce azotanu amonu (0,38 gN/pojemnik) wartość F_V/F_M zmniejszyła się o 5,0%, a przy równie obniżonej dawce siarczanu amonu wartość tego parametru zmniejszyła się o 3,8%.

Przeprowadzone badania wskazują, że zmniejszona podaż azotu spowalnia rozwój roślin rzepaku i ogranicza biosyntezę chlorofilu przy jednoczesnym zachowaniu możliwie wysokiej sprawności reakcji w fazie świetlnej fotosyntezy. Z porównania skuteczności działania obu nawozów amonowych wynika, że nawożenie azotowo-siarkowe w istotnej mierze poprawiło wykorzystanie dostępnego azotu przez rośliny rzepaku, wzrosła biosynteza chlorofilu oraz sprawność fotosyntetycznej konwersji energii fotonów PAR.

Efekt zastosowania nawożenia azotowego jest zwykle łatwo zauważalny przyczyniając się do istotnego zwiększenia plonów. Rodzi to pokusę stosowania dużych dawek tego nawozu, co oprócz zwiększenia kosztów uprawy może wywoływać różnorodne skutki negatywne, jak np. wyleganie zbóż, nagromadzenie w roślinach nadmiernych ilości azotanów i azotynów, a także zanieczyszczenie gleby i wód odpływowych związkami azotu. Nadmiar związków azotowych wprowadzanych do środowiska glebowego jest również szkodliwy ze względów ekologicznych, bowiem może przyczyniać się do eutrofizacji wód śródlądowych, a wytwarzany przez mikroflorę glebową N_2O należy do głównych gazów szklarniowych. Z powyższych względów pożądana jest optymalizacja nawożenia azotowego przy możliwie małych dawkach, właściwie dobranych form nawozów oraz częsta kontrola zapotrzebowania na ten pierwiastek w kolejnych fazach rozwoju uprawianych roślin.

W następnym doświadczeniu nawozowym badano wpływ wzrastających dawek azotanu amonu na przebieg IFL chlorofilu, zawartość chlorofilu w liściach, natężenie fotosyntezy netto oraz zmianę powierzchni i suchej masy liści młodych roślin kukurydzy. Zastosowane dawki azotanu amonu (0,3, 0,9 i 2,7 gN/pojemnik) pozytywnie wpłynęły na biosyntezę chlorofilu w liściach zwiększając jego zawartość odp. o 38%, 96% i o 129% (w stosunku do wariantu bez nawożenia). Pomiary zawartości chlorofilu były przeprowadzane przy użyciu miernika SPAD – 502 na 4 lub 5 liściu 35 dniowych roślin kukurydzy odm. Smolimag.

Przy najwyższym poziomie nawożenia zawartość chlorofilu przekroczyła 40 jednostek (SPAD), co według danych literaturowych jest wartością typową dla roślin kukurydzy dobrze zaopatrzonych w azot. Zawartość chlorofilu w liściach większości roślin uprawnych jest dobrze skorelowana z odżywieniem azotem i dlatego ten sposób pomiaru przeprowadzanego *in situ* może być cennym narzędziem do kontroli oraz **optymalizowania nawożenia azotowego**.

Wzrastające dawki azotu (0,3, 0,9 i 2,7 gN/pojemnik) w istotnej mierze zwiększały wydajność fotosyntezy netto odp. o 12%, 32% i 83%, natomiast w znacznie mniejszym stopniu zwiększały wartość parametru F_V/F_M (miarę efektywności reakcji fotochemicznej w PS II) odp.: 0,757, 0,774 i 0,809.

Podobne efekty odnotowano przy badaniach prowadzonych na roślinach rzepaku, którym nawet najniższa dawka nawozu amonowego (0,38 gN/pojemnik) umożliwiała dostatecznie sprawny przebieg reakcji w fazie świetlnej fotosyntezy. Powierzchnia liści oraz ich sucha masa osiągnęły swoje maksima przy dawce 0,9 gN/pojemnik, powiększając sumaryczne pole powierzchni liści ok. 4-krotnie, a suchą masę ok. 3 razy. Zwiększenie dawki nawozu do 2,7 gN/pojemnik nie spowodowało już istotnych zmian w wartościach obu tych cech.

Współczesne rolnictwo i ogrodnictwo tworzą specyficzny **agroekosystem**, który może istnieć tylko przy daleko idącej ingerencji człowieka. Rośliny uprawne uformowane w wyniku wielowiekowych zabiegów hodowlanych oraz selekcyjnych, zatraciły w znacznym stopniu zdolność współzawodniczenia z innymi roślinami endemicznymi (nazwanymi chwastami) na rzecz zwiększonej produktywności i odpowiedniej modyfikacji jakościowej plonu. W praktyce rolniczej wymagane jest stosowanie odpowiednich zabiegów agrotechnicznych (zwykle czaso- i energochłonnych) oraz stosowania specjalnych środków chemicznych, które ochraniają rośliny uprawiane przed konkurencją ze strony chwastów i agrofagów. Tylko dzięki stosowaniu **herbicydów** (h.) udaje się w skali światowej ograniczyć straty plonów spowodowane konkurencją ze strony chwastów, do kilkunastu procent. Preferowane jest stosowanie h. selektywnych, które eliminują pewne grupy chwastów, nie uszkadzając jednocześnie ochranianych roślin uprawnych. Ważną i liczną grupę herbicydów (ok. 30% wszystkich h.) stanowią inhibitory FTE, określane najczęściej, jako **inhibitory fotosyntezy**. Do tej grupy należą pochodne mocznika (np. linuron), triazyny (np. atrazyna) pochodne diazyny (np. pyrazon), karbaminiany (np. fenmedifan) i niektóre inne herbicydy o mniejszym znaczeniu.

Mechanizm działania tych herbicydów polega na przyłączeniu swojej cząsteczki do białka D1, z którym związany jest plastochinon PQ_B będący akceptorem elektronów w PS II. Zmienia to do takiego stopnia właściwości oksydoredukcyjne PQ_B, że szybkość przepływu elektronów pomiędzy akceptorami PQ_A i PQ_B może ulec nawet 20 krotnemu zmniejszeniu. W konsekwencji maleje produkcja tzw. **siły asymilacyjnej** (ATP i NADPH) i zmniejsza się szybkość asymilacji CO_2. W takiej sytuacji wzbudzone przez PAR elektrony w PS I, zamiast na $NADP^+$, mogą być przekazywane na O_2 generując anionorodnik $O_2^{-\cdot}$, bardzo aktywny utleniacz składników komórki. Podwyższona koncentracja $O_2^{-\cdot}$ w błonach tylakoidów sprzyja degradacji chlorofilu oraz może zainicjować proces wolnorodnikowego utleniania lipidów membranowych w chloroplastach.

Zmiany konformacyjne w białku D1 spowodowane przyłączeniem cząsteczki herbicydu inhibitora fotosyntezy, nie tylko blokują FTE w PS II, ale także znacznie zmieniają przebieg IFL chlorofilu, zwiększają natężenie FL stacjonarnej oraz bardzo silnie wpływają na szybkość zaniku OL chlorofilu. Wymienione modyfikacje luminescencji chlorofilu mogą być wykorzystywane do oceny fitotoksyczności znanych lub nowosyntetyzowanych preparatów chwastobójczych, a także służyć do badania odporności gatunkowej i odmianowej roślin uprawnych na tego typu herbicydy.

Do oceny fitotoksyczności popularnych herbicydów: prometryny (h. triazynowy) oraz linuronu (h. mocznikowy) wykorzystano krążki z liści ogórka, które przez 4 godziny pasywnie infiltrowano roztworami tych h.: (0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 i 30 $\mu mol \cdot dm^{-3}$). Stopień inhibicji FTE oceniano poprzez względną zmianę wartości parametru L_D, który określa szybkość zaniku OL chlorofilu w zakresie od 0,5 s do 16 s. Jako miernik fitotoksyczności przyjęto stężenie wodnego roztworu danego herbicydu $W(L_D)_{50}$, przy którym wartość L_D obniżała się do połowy wartości tego parametru w kontroli (tzn. wyznaczonej dla krążków liściowych inkubowanych na powierzchni wody). Wyniki tego testu wskazują, że dla młodych roślin ogórka bardziej niebezpieczny jest linuron, bowiem przy dolistnym jego zaaplikowaniu $W(L_D)_{50}$ wynosi $0{,}6 \cdot 10^{-7}$ $mol \cdot dm^{-3}$, natomiast dla prometryny $W(L_D)_{50}$ wynosi $1{,}5 \cdot 10^{-7}$ $mol \cdot dm^{-3}$. W porównaniu z dotychczas stosowanymi testami fitotoksyczności (z wykorzystaniem zawiesiny chloroplastów), proponowana metoda luminescencyjna jest tania, szybka i mało pracochłonna, bowiem w ciągu 8 godzin pozwala określić wartości $W(L_D)_{50}$ dla 4 środków chwastobójczych, wykorzystując do tego krążki liściowe z dowolnych roślin uprawnych (chronionych) lub chwastów (eliminowanych).

Następnym celem badań było zbadanie toksyczności pyrazonu (h. diazynowego) i fenmedifanu (h. karbaminianowego) w stosunku do młodych roślin buraka ćwikłowego oraz roślin komosy białej, pospolitego chwastu występującego dosyć często na urodzajnych glebach i należącego do tej samej rodziny komosowatych co burak. Oba badane związki stosuje się do zwalczania chwastów w uprawach buraków ponieważ są dobrze przez te rośliny tolerowane. Tolerancja roślin buraka na te herbicydy związana jest najprawdopodobniej z wewnątrzkomórkową detoksykacją ich substancji aktywnych w specyficznych reakcjach biochemicznych. Do badań pobierano po 2 krążki wycięte z środkowych części liści buraka. W każdej serii było 6 par krążków wyciętych z liści należących do 6 roślin buraka. Jeden z krążków każdej pary był umieszczany na powierzchni roztworu pyrazonu o stężeniu

100 μmol·dm^{-3}, natomiast drugi na powierzchni wody (próba kontrolna). Tak samo postępowano z parami krążków wyciętymi z liści komosy. Po 4 godzinach przeprowadzono na obu próbach pomiary OL i wyznaczano L_D. Po pomiarach krążki poddawano restytucji, umieszczając je na szalkach z wodą destylowaną i wraz z próbą kontrolną pozostawiając na 24 godziny w temp. pokojowej i słabym świetle. Po tym czasie powtórnie wykonywano na nich pomiary OL chlorofilu i wyznaczano wartość L_D. W celu określenia fitotoksyczności obliczano względne (względem próby kontrolnej i wyrażone w procentach) zmiany wartości tego parametru.

Pod wpływem infiltracji roztworem pyrazonu względne wartości parametru L_D w liściach buraka i komosy znacznie się obniżyły: odp. do ok. 2% i 1%. Po okresie restytucji, w krążkach z liści buraka wartość L_D wzrosła do ok. 60%, natomiast w krążkach z liści komosy wartość tego parametru osiągnęła zaledwie 4,6% wartości kontroli. Takie same badania fitotoksyczności roztworu fenmedifanu (również 100 μmol·dm^{-3}) w stosunku do buraka i komosy wykazały spadek wartości względnych wartości odp. do ok. 4% i 3%. Po dobowej restytucji nastąpił wzrost tego parametru do ok. 44% w liściach buraka i tylko do 4,2% w liściach komosy.

Uzyskane wyniki wskazują, że pod wpływem dużego stężenia obu testowanych h., zarówno w liściach buraka jak i komosy nastąpiło prawie całkowite zablokowanie FTE w aparacie fotosyntetycznym. Po okresie restytucji mechanizmy detoksykacyjne w komórkach buraka, w odróżnieniu od komosy, w znacznym stopniu odtworzyły swoją poprzednią aktywność FTE. Niskie względne wartości L_D świadczą, że zastosowana dawka obu herbicydów prawie całkowicie zablokowała FTE w liściach komosy i w bliskiej przyszłości nastąpi całkowita eliminacją tych roślin.

Problemem jaki stworzyła powszechna chemizacja ochrony roślin jest pojawienie się w obrębie znanych gatunków chwastów nowych genotypów odpornych na wysokoselektywne herbicydy. Przeprowadzone badania ujawniły, że przyczyną tej odporności są **mutacje genetyczne** powstające samorzutnie w niektórych roślinach danego siedliska, a wieloletnie chemiczne odchwaszczanie wyselekcjonowało takie genotypy. Poznano ponad 50 gatunków chwastów, wśród których wykryto osobniki triazynoodporne. Taką samą mutację odkryto u niektórych roślin uprawnych, np. rzepaku i rzepiku.

Odporność na h. triazynowe wynika z mutacji genu chloroplastowego *psb* A, który koduje białko D1 (32 kDa) pełniące nie tylko ważną rolę w transporcie elektronów, ale również będące miejscem przyłączania cząsteczek h. należących

do typu inhibitorów fotosyntezy. Modyfikacja w strukturze D1 uniemożliwia lub poważnie utrudnia jego związanie z cząsteczkami h. triazynowych (w mniejszym stopniu dotyczy to h. mocznikowych). Odkrycie to nasunęło pomysł wyhodowania odmian roślin uprawnych posiadających w taki sam sposób zmodyfikowany genom. Tak powstała triazynoodporna (TR) odmiana rzepaku Triton. Niestety mutacja D1 zmieniła także właściwości oksydoredukcyjne PQ_B (plastochinonowego akceptora elektronów przyłączonego do D1 w miejscu Q_B) i efektywność przekazywania elektronów pomiędzy akceptorami PQ_A i PQ_B znacznie zmalała. Obniżyło to nie tylko wydajność FTE, ale jednocześnie spowodowało wzrost podatności tych roślin na uszkodzenia fotoinhibicyjne. Dalsze prace hodowlane pozwoliły uzyskać genotypy TR wykazujące nieco polepszoną wydajność fotosyntezy, czego dowodem są dwuzerowe rody rzepaku ozimego 5972/2/89 i 7841/1i/95 z Poznańsko - Gorzowskiego Oddziału IHAR.

Anomalia w budowie białka D1 i związana z tym dysfunkcja PQ_B powodują zmiany w przebiegu IFL chlorofilu oraz charakterystyczną modyfikację krzywej zaniku OL (mała wartość L_D) w roślinach TR.

Badano oddziaływanie atrazyny i azyprotryny (h. triazynowe) oraz linuronu (h. mocznikowy) na rośliny rzepaku odm. Lirajet - LJ oraz rośliny należące do TR rodu 5972/2/89. Do badań pobierano po 4 krążki, wycięte ze środkowych części II liści roślin obu genotypów, które umieszczano na powierzchniach roztworów herbicydów (serie po 6 sztuk) oraz jedną serię kontrolną na powierzchni wody. Wszystkie roztwory h. posiadały stężenie 4 $\mu mol \cdot dm^{-3}$. Po 4 godzinach pasywnej infiltracji tymi roztworami rejestrowano przebiegi IFL chlorofilu oraz przeprowadzono pomiary L_D we wszystkich badanych próbkach liści rzepaku. Wyznaczano parametry: F_V/F_M, A_M, Rfd oraz L_D, a następnie obliczono względne wartości (względem kontroli) tych parametrów dla prób poddanych działaniu herbicydów.

Z porównania wartości parametrów wyznaczonych dla serii kontrolnych obu badanych genotypów wynika, że sprawność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w roślinach rzepaku TR jest istotnie niższa od sprawności tych reakcji u roślin LJ posiadających prawidłowo ukształtowaną białkową strukturę PS II. Szczególną uwagę zwraca znacznie (bo ponad 20 krotnie) mniejsza wartość L_D wyznaczona dla roślin TR w porównaniu z LJ. Wartość wskaźnika witalności – Rfd u roślin rodu TR jest o 45% niższa w porównaniu z wartością tego wskaźnika u roślin LJ. Tak znaczne zakłócenia reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w roślinach TR tłumaczą ich niższą produktywność (nawet o 30% w warunkach uprawy polowej), w porównaniu z produktywnością tradycyjnych odmian rzepaku.

Z przeprowadzonych badań nad oddziaływaniem trzech herbicydów należących do wspólnej klasy inhibitorów fotosyntezy i zastosowanych w jednakowych stężeniach molowych na liście roślin rzepaku odm. LJ i TR wynika, że najbardziej szkodliwym dla obu genotypów okazał się linuron. Najmniej szkodliwym h. dla roślin LJ okazała się azyprotryna (z grupy metylotiotriazyn, s.a. Mesoranilu), natomiast dla TR atrazyna (z grupy chlorotriazyn, s.a. Azotopu).

Parametr L_D najsilniej różnicował zarówno stopień inhibicji reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w liściach LJ i TR wywołane działaniem tego samego herbicydu, jak również ujawniał różnice w fitotoksycznym oddziaływaniu trzech badanych herbicydów na dany genotyp rzepaku. Przy zastosowaniu detekcji OL chlorofilu i wyznaczając L_D można z dużą czułością określać fitotoksyczność, a także dodatkowo oceniać w badanych genotypach stopień zróżnicowania ich odporności na herbicydy chlorotriazynowe i metylotiotriazynowe.

Herbicydy – inhibitory fotosyntezy hamując FTE zwiększają wydajność stacjonarnej FL chlorofilu (λ_{max} = 685 nm). Przeprowadzono badania mające na celu zastosowanie **metody fotograficznej** do rejestracji dróg penetracji tkanek asymilacyjnych roślin przez preparaty chwastobójcze blokujących proces fotosyntezy i szybkiej oceny ich fitotoksyczności.

Do badań wykorzystano liście fasoli, których ogonki natychmiast po odcięciu zanurzano w naczyniach z wodą (kontrola) lub z roztworem preparatu Gesaprim 50 WP o stężeniu ok. 100 μmoli atrazyny będącej substancją czynną tego herbicydy. Naczynia wraz z odciętymi liśćmi umieszczano na stanowisku do makrofotografii, a FL chlorofilu wzbudzano monochromatycznym światłem lamp sodowych (λ_{max} = 589 nm). Liście fotografowano na wysokoczułej (30 DIN, 800 ASA) błonie fotograficznej w określonych odstępach czasu (np. co 30 minut).

Opracowana metoda fotograficznej rejestracji FL chlorofilu dostarcza informacje o zdolności wnikania h. - inhibitorów fotosyntezy do tkanek liści chwastów i roślin chronionych, drogach przemieszczania się tych substancji oraz zdolności roślin do ich metabolizowania lub neutralizacji. Przy produkcji preparatów chwastobójczych istotną rolę odgrywa dobór odpowiedniego nośnika oraz specjalnych dodatków nazywanych adiuwantami, które ułatwiają penetrację substancji aktywnej do wnętrza rośliny. Częściową odpowiedź na te pytania uzyskiwano posługując się preparatami znakowanymi radioizotopami. Proponowana metoda fotograficznej rejestracji FL chlorofilu w zastosowaniu do kontroli przemieszczania się h. - inhibitorów fotosyntezy w tkankach roślin ma szereg zalet i z powodzeniem może zastąpić kosztowne metody radioizotopowe.

Inną dziedziną zastosowania tej metody może być jej wykorzystanie do **oceny wpływu czynników stresowych na efektywność fotosyntezy**, a pośrednio i na stan fizjologiczny roślin. Wydajność FL chlorofilu w zielonych tkankach roślin jest zwykle ujemnie skorelowana ze sprawnością reakcji fazy świetlnej fotosyntezy. Efektywność procesu fotosyntezy zmienia się podczas ontogenezy rośliny i zależy od jej uwarunkowań genetycznych. Większość czynników stresowych zakłóca przebieg reakcji fotosyntezy i niejednokrotnie wywołuje wczesne zmiany strukturalne na poziomie subkomórkowym niezauważalne dla obserwatora. Przy użyciu opisanej metody można byłoby zlokalizować w liściach miejsca specjalnie wrażliwe na dany czynnik stresowy (np. ozon, fitotoksyny, UV-B, smog fotochemiczny), ocenić stopień ich uszkodzenia, a także zdolność do restytucji zakłóconych funkcji i naprawy struktur komórkowych.

Zastosowanie nowej generacji aparatów cyfrowych uczulonych w dalekiej czerwieni i współdziałających z komputerami może stać się dużym ułatwieniem i poszerzyć możliwości wykorzystywania tej luminescencyjnej techniki badawczo-diagnostycznej w dziedzinie ochrony roślin oraz ekofizjologii.

Nadmiar PAR jest często występującym czynnikiem stresowym, któremu zwykle towarzyszą inne niekorzystne dla roślin czynniki, jak np. wysoka i niska temperatura, susza, niedobór CO_2, deficyt składników mineralnych, skażenie chemiczne i in. Jednoczesne oddziaływanie na rośliny silnego promieniowania świetlnego i innych czynników stresowych wytwarza warunki tzw. multistresu, który przejawia się w znacznym spotęgowaniu ujemnych efektów prowadzących do **fotoinhibicji** procesu fotosyntezy, a nierzadko i do **stresu oksydacyjnego**.

Zjawisko fotoinhibicji ma miejsce wówczas, gdy zielone tkanki roślin pochłoną więcej energii promieniowania PAR niż są w stanie przetworzyć na energię chemiczną. Fotoinhibicja przejawia się w zakłóceniu procesu fotosyntezy, a pierwotnym miejscem uszkodzeń jest PS II. Podczas silnego oświetlenia, gdy wzbudzone elektrony nie mogą być dostatecznie szybko przekazywane z centrum PS II na PQ_A, może nastąpić przekazanie energii wzbudzenia z tego centrum na O_2, co powoduje przekształcenie cząsteczki tlenu znajdującego się w stanie trypletowym w bardziej reaktywną formę **tlenu singletowego** $^1O_2$. Wytworzony $^1O_2$ ma zdolność utlenienia centrum reakcji PS II, a także może spowodować denaturację D1. Zasadniczą przyczyną obniżenia aktywności PS II pod wpływem silnego światła jest inhibicja FTE, a w następnej kolejności uszkodzenie D1. Spośród białek tworzących rdzeń PS II właśnie D1 ulega wyjątkowo intensywnej wymianie, a szybkość tej wymiany może wzrosnąć nawet dziesiątki razy podczas silnego oświetlenia. Możliwość

sprawnej i szybkiej wymiany uszkodzonych makrocząsteczek białkowych na nowe jest korzystna dla rośliny, ponieważ przyspieszając proces restytucji pozwala na utrzymywanie względnie dobrej aktywności PS II, nawet w warunkach sprzyjających umiarkowanej fotoinhibicji.

Rośliny ulegają stresowi oksydacyjnemu, gdy przy silnym napromieniowaniu PAR, przestają wystarczać mechanizmy rozpraszania nadmiaru energii wzbudzenia, a system przeciwutleniający nie jest w stanie zabezpieczyć komórki roślinne przed szkodliwym działaniem tlenu (zwłaszcza w jego reaktywnych formach). W okresach silnego nasłonecznienia i podwyższonej temperatury do stresu oksydacyjnego w dużym stopniu przyczyniają się gazowe zanieczyszczenia powietrza, pochodzące ze spalin samochodowych oraz emisji wielkoprzemysłowych jak np. tlenki azotu, ozon, i nadtlenek acetyloazotanu (PAN), tworzące tzw. **smog fotochemiczny** mający silne właściwości utleniające.

Rośliny wykształciły w toku ewolucji sprawny **system antyoksydacyjny** (przeciwutleniający), którego celem jest minimalizacja negatywnych efektów wywołanych działaniem tlenu. System ten tworzą zarówno nieenzymatyczne (askorbinian, glutation, α-tokoferol i β-karoten), jak i enzymatyczne przeciwutleniacze (np. dysmutazy ponadtlenkowe, peroksydaza askorbinowa, reduktaza dehydroaskorbinowa oraz reduktaza glutationowa).

Ozon i inne składniki smogu fotochemicznego po wniknięciu do cytoplazmy komórek roślinnych ulegają przemianom, podczas których wytwarzane są także i inne reaktywne formy tlenu (**RFT**), jak np. $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ i H_2O_2. Zwiększone stężenie RFT powoduje wzrost aktywności oddychania, zmniejszenie asymilacji CO_2 i wzmożenie biosyntezy etylenu. W komórkach wzrasta również akumulacja flawonoidów, poliamin i fitoaleksyn, a także rośnie zawartość związków przeciwutleniających, takich jak: askorbinianu, α-tokoferolu, glutationu i enzymów antyoksydacyjnych. Zaindukowane modyfikacje składu cytoplazmy mają charakter obronny i przystosowują komórki do przezwyciężenia stresu oksydacyjnego.

Dla roślin szczególnie niebezpieczne jest zakłócenie procesu fotosyntezy spowodowane nadmiarem PAR w połączeniu z innymi czynnikami stresowymi, np.: smog fotochemiczny, czynniki klimatyczne (wysoka i niska temperatura, susza), UV-B, jony metali ciężkich, herbicydy. W wyniku nieprawidłowego przebiegu reakcji foto-syntezy następuje wzmożona generacja RFT w chloroplastach i możliwe jest zaistnienie stresu oksydacyjnego będącego reakcją rośliny na oddziaływanie całego kompleksu niekorzystnych czynników środowiska.

Jednym z bardziej groźnych efektów stresu oksydacyjnego jest peroksydacja fosfolipidów, czyli wolnorodnikowe utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach biologicznych wywołane przez RFT. Przy dłuższej ekspozycji roślin na działanie gazowych utleniaczy lub innych czynników stresowych wzrasta niebezpieczeństwo tego rodzaju utleniania w błonach biologicznych, a szczególnie w tylakoidach.

Ponieważ reakcje wolnorodnikowe mają charakter łańcuchowy w ich wyniku może zostać w krótkim czasie wytworzona duża ilość rodników nadtlenkowych, co grozi destrukcją błon komórkowych, zakłóceniem przebiegu fosforylacji i pogorszeniem selektywnej przepuszczalności błon. W dalszej kolejności następują negatywne zmiany w ultrastrukturze chloroplastów oraz zanikanie chlorofilu.

Podczas peroksydacji generowana jest bardzo słaba chemiluminescencja, będąca ubocznym efektem rekombinacji niewielkiej części powstających nadtlenków. Pomiary tego świecenie, nazwanego ultrasłabą biochemiluminescencją (**UBCL**) można wykorzystać do oceny niesprawności procesów warunkujących homeostazę komórki, a z analizy zmian intensywności UBCL podczas działania czynników stresowych można wnioskować o skuteczności ochrony struktur oraz funkcji komórkowych przez system przeciwutleniający.

Potencjał ochrony antyoksydacyjnej należy do głównych czynników umożliwiających przezwyciężanie warunków stresowych. Bardzo wrażliwe na ozon i smog fotochemiczny są rośliny niektórych odmian tytoniu np. Bel-W3. Rośliny tytoniu tej odmiany są kilkakrotnie bardziej wrażliwe na działanie ozonu (oraz innych gazowych utleniaczy) niż rośliny tytoniu należące do odmian tolerancyjnych jak np. Bel-B. Już po 2 h ekspozycji roślin odmiany Bel- W3 na 0,06 ppm O_3 (przeciętne stężenie ozonu w troposferze wynosi ok. 0,03 ppm) można na liściach zaobserwować nekrozy w postaci brązowawych plamek. Ilość tych plamek może służyć jako wskaźnik zanieczyszczenia powietrza przez utleniacze gazowe.

W celu zbadanie wpływu **zanieczyszczonego powietrza miejskiego** w porze letniej na stan fizjologiczny roślin dwóch odmian tytoniu (Bel-B i Bel-W3) o zróżnicowanej odporności na stres oksydacyjny wykonano pomiary: FL chlorofilu (F_V/F_M, Rfd, ETR, Y, qP), zawartości chlorofilu (SPAD), fotosyntezy netto (P_N) i transpiracji (E), aktywności enzymów antyoksydacyjnych, UBCL tkanek liściowych, przepuszczalności błon komórkowych (wskaźnik uszkodzeń – k) oraz suchej masy (s. m.) badanych krążków liściowych. Do badań pobierano najmłodsze, w pełni rozwinięte liście roślin tytoniu należące do odmiany Bel-B oraz Bel-W3 wrażliwej na stres oksydacyjny, a zwłaszcza na działanie ozonu.

Rośliny tytoniu uprawiano w okresie letnim w warunkach szklarniowych, bez dostępu zanieczyszczonego powietrza miejskiego. Po 6 tygodniach część pojemników z roślinami obu odmian (ozn. **S**) umieszczono w miejscu, gdzie był zapewniony swobodny dostęp powietrza zanieczyszczonego spalinami samochodowymi. Po 7 dniach wzrostu w zmienionej atmosferze wykonano pomiary wszystkich założonych wskaźników na liściach obu odmian tytoniu. Takie same pomiary przeprowadzono na liściach roślin obu odmian tytoniu pozostawionych w dotychczasowych warunkach wzrostu (ozn. **K**).

W celu możliwie obiektywnej oceny stopnia zanieczyszczenia powietrza gazami o działaniu oksydacyjnym (głównie przez O_3 i tlenki azotu) określono metodą wizualną uszkodzenia blaszek liściowych obu odmian tytoniu. Po 7 dniach ekspozycji roślin na powietrze uliczne – **S** dokonano ocenę bonitacyjną, z której wynika, że średni udział powierzchni nekroz pokrywających piąty liść roślin tytoniu odm. Bel-W3 wynosi ok. 5 ÷ 6% całej powierzchni blaszki liściowej, co odpowiada trzeciemu stopniowi uszkodzeń (w siedmiostopniowej skali). Na liściach roślin serii **K** nie znaleziono śladów przebarwień lub nekroz.

Z porównania zawartości chlorofilu zmierzonej w liściach roślin grupy **K** i **S** wynika, że stres oksydacyjny nie spowodował fotodegradacji tego barwnika w liściach Bel-B, a znacząco obniżył zawartość chlorofilu w liściach tytoniu odm. Bel-W3. Efekt ten może wyjaśniać zjawisko powstawania plamek nekrozowych na liściach tej odmiany tytoniu.

Z przeprowadzonych pomiarów luminescencyjnych (FL chlorofilu i UBCL) oraz zawartości chlorofilu w liściach tytoniu odm. Bel-W3 ze serii **K** wynika, że wykazują one nieco niższe (nieistotne statystycznie) wartości wszystkich oznaczonych cech w porównaniu z analogicznymi cechami u odmiany tolerancyjnej Bel-B. Pomiary aktywności enzymów o własnościach antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej SOD, katalazy oraz peroksydazy wykazały, że u roślin odm. Bel-W3 aktywność peroksydazy jest aż o 28% niższa w porównaniu z aktywnością tego enzymu w roślinach odmiany tolerancyjnej. Niższa aktywność peroksydazy w liściach tytoniu Bel-W3 może do pewnego stopnia tłumaczyć większą wrażliwość roślin tej odmiany na czynniki utleniające.

Pod wpływem zanieczyszczonego spalinami samochodowymi powietrza w roślinach obu badanych odmian tytoniu należących do serii **S** uległy obniżeniu wartości prawie wszystkich mierzonych cech. Z wyjątkiem F_V/F_M, wartości pozostałych parametrów są u roślin odm. Bel-W3 istotnie niższe od wartości tych samych parametrów wyznaczonych dla odmiany tolerancyjnej Bel-B.

Niższa aż o 69% wydajność fotosyntezy P_N u roślin odm. Bel-W3 świadczy, że przyczyną obniżenia wydajności była, zarówno mniejsza (o ok. kilkanaście procent) efektywność reakcji fazy świetlnej, ale również nastąpiła inhibicja reakcji enzymatycznych w fazie ciemnej. Konsekwencją obniżonej produktywności fotosyntetycznej jest mniejsza o 35% sucha masa dysków z liści odmiany Bel-W3 w porównaniu z suchą masą dysków z liści odmiany tolerancyjnej.

Uwagę zwraca bardzo znaczny wzrost emisji UBCL (ok. pięciokrotny u roślin Bel-B i aż 7,5-krotny u roślin wrażliwej odm. Bel-W3), co świadczy o wzmożonej peroksydacji fosfolipidów w błonach komórkowych wywołanej przez RFT. Wyższy poziom emisji UBCL w tkankach liści wrażliwej odmiany tytoniu świadczy o mniejszej aktywności układu antyoksydacyjnego, na co wskazują także wcześniej wykazana mniejsza aktywność peroksydazy w liściach tej odmiany. Podwyższona emisja UBCL z tkanek liści odmiany Bel-W3 prognozuje także degradację biomembran komórkowych, czego bezpośrednim dowodem jest prawie pięciokrotnie wyższy (w porównaniu z roślinami Bel-B) wskaźnik uszkodzeń struktur komórkowych – $k \cdot 10^3$ wyznaczony metodą konduktometryczną.

Rezultaty przeprowadzonych badań potwierdzają prognozy realnego zagrożenia dla wegetacji roślin (zwłaszcza dla procesu fotosyntezy) przez stres oksydacyjny, którego główną przyczyną jest bardzo szybki **rozwój motoryzacji**, a w bliskiej przyszłości także **ocieplenie klimatu** wskutek efektu szklarniowego. Widocznymi efektami stresu oksydacyjnego jest przyspieszone zamieranie i opadanie liści obserwowane w zadrzewieniach miejskich oraz obniżenie plonów roślin wrażliwych (np. soi i ryżu). Stres oksydacyjny nasila się w okresie letnim i jest zwykle poprzedzony fotoinhibicją procesu fotosyntezy. Wczesne jego wykrycie, ocena potencjalnych zagrożeń oraz minimalizacja negatywnych efektów ekologicznych i gospodarczych wymagają zastosowania nowych (np. luminescencyjnych, teledetekcyjnych) metod monitorowania stanów stresowych szczególnie w agrocenozach i w ekosystemach leśnych.

6. WNIOSKI OGÓLNE

1. Wyniki badań i wnioski z nich wypływające przedstawiono w 17 szczegółowych opisach zadań badawczych (zamieszczonych w części doświadczalnej 4) pozwalają uznać, że metody luminescencyjne (fluorescencja chlorofilu, opóźniona luminescencja chlorofilu i ultrasłaba biochemiluminescencja) dostarczyły wystarczająco pełne informacje o reakcjach roślin na zastosowane czynniki stresowe.
2. W celu rozwiązania niektórych przedstawionych zadań badawczych konieczne było wykonanie dodatkowo innych pomiarów (np. gazometrycznych, konduktometrycznych, zawartości chlorofilu, biometrycznych), których wyniki uzupełniały lub weryfikowały rezultaty uzyskane na drodze pomiarów luminescencji biologicznych.
3. Dużą zaletą przedstawionych metod wykorzystujących luminescencje biologiczne jest ich mała pracochłonność, łatwa obsługa aparatury pomiarowej i możliwość integralnej oceny jednoczesnego oddziaływania kilku czynników stresowych na rośliny. Jest to istotna zaleta w pracach hodowlanych (np. selekcji roślin przy aklimatyzacji nowych odmian), eksperymentach bioinżynieryjnych, w pracach z kulturami *in vitro* oraz monitoringu ekologicznym.
4. Fluorescencja oraz opóźniona luminescencja chlorofilu są ściśle związane z przemianami energetycznymi w reakcjach fazy świetlnej fotosyntezy i dlatego wyniki pomiarów luminescencji chlorofilu mogą stanowić istotny wkład do oceny stanu fizjologicznego roślin w czasie ich ontogenezy, a także mogą spełniać rolę czułych sygnalizatorów nieprawidłowości w przebiegu tego procesu spowodowanego zarówno czynnikami zewnętrznymi jak mutacjami genetycznymi.
5. Metody luminescencyjne cechuje duża czułość, a pomiary są wykonywane w sposób nieinwazyjny mogą więc być przeprowadzane zarówno w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem bardzo małych próbek tkanek roślinnych, jak również w warunkach polowych na całych roślinach *in vivo*, przy użyciu przenośnej aparatury.
6. Zaletą pomiarów luminescencyjnych jest możliwość ich częściowej lub pełnej automatyzacji, bowiem wyniki są uzyskiwane w postaci numerycznej, przetwarzane przez układy mikroprocesorowe, a opracowanie, magazynowanie i prezentacja danych następuje przy wykorzystaniu techniki komputerowej.

7. PIŚMIENNICTWO

1. **Abeles F. B.:** Plant chemiluminescence. Annu. Rev. Plant Physiol., 37, 49-72, 1986.
2. **Adamczewski K.:** Wpływ oleju lnianego na fitotoksyczne działanie bentazonu w zależności od niektórych czynników siedliska. Rocz. Nauk Rol., Ser. E, t. 8, 1, 9-55, 1978.
3. **Ali A., Fuerst E. P., Arntzen C. J., Suza Machado V.:** Stability of chloroplastic triazine resistance in Rutabaga backcross generations. Plant Physiol. 80, 511-514, 1986.
4. **Antonielli M., Pasqualini S., Ederli L., Batini P., Moscatello S., Loreto F.:** Physiological characteristics of tobacco cultivars with contrasting sensitivity to ozone. Environ. Exp. Bot., 38, 271-277, 1997.
5. **Badiani M., Dannibale A., Paolacci A. R., Miglietta F., Raschi A.:** The antioxidant status of soybean (*Glicine max.*) leaves grown under natural CO_2 enrichment in the field. Aust. J. Plant Physiol., 20(3), 275-284, 1993.
6. **Bahl A., Loitsch S. M., Kahl G.:** Air pollution and plant gene expression. In: Plant responses to the environment. Chapter 6. CRC Press, Inc., 71-96, 1993.
7. **Baker N. R., Long S. P., Ort D. R.:** Photosynthesis and temperature, with particular reference to effects on quantum yield. In: Plant and temperature. Great Britain Soc. for Exp. Biol., 347-375, 1988.
8. **Bandurska H.:** Rola proliny w reagowaniu roślin na stres deficytu wody w świetle dotychczasowych wyników badań. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 469, 31-42, 1999.
9. **Barber J.:** The isolated photosystem two reaction centre reveals details of the molecular processes of photoinhibition. Photosynthetica, 27 (1-2), 63-80, 1992.
10. **Barker A. V.:** Nutritional factors in photosynthesis in higher plants. J. Plant Nutrition, 1(3), 309-342, 1979.
11. **Bartosz G.:** Druga twarz tlenu. WN PWN, Warszawa, 1995.
12. **Bilger H. W., Schreiber U., Lange O. L.:** Determination of leaf heat resistance: comparative investigation of chlorophyll fluorescence changes and tissue necrosis methods. Oecologia, 63, 256–262, 1984.
13. **Bolhàr-Nordenkampf H. R., Öquist G.:** Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual. (Eds. Hall D. O. et al.) Chapman & Hall, London, (12), 193-206, 1993.
14. **Bouchereau A., Azis A., Larher F., Martin-Tanguy J.:** Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant Sci. 140: 103-125, 1999.
15. **Bowler C., van Montagu M., Inze D.:** Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol., 43, 83-116, 1992.
16. **Brooks A., Farquhar G. D.:** Effect of temperature on the CO_2/O_2 specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase and the rate of respiration on the light. Planta, 165, 397–406, 1985.
17. **Brüggemann W., van der Kooij T. A. W., van Hasselt P. R.:** Long term chilling of young tomato plants under low light and subsequent recovery. I. Growth development and photosynthesis. Planta, 186, 172-178, 1992.

18. **Brüggemann W., Beyel V., Brodka M., Poth H., Weil M., Stockhaus J.:** Antioxidants and antioxidative enzymes in wild-type and transgenic *Lycopersicon* genotypes of different chilling tolerance. Plant Sci., 140 (2), 177-189, 1999.
19. **Brzóstowicz A., Prokowski Z., Murkowski A., Grabikowski E.:** Use of the delayed luminescence test for evaluation of changes in frost resistance of winter wheat. Acta Agrobot., 38(1), 5-10, 1985.
20. **Bukhov N. G., Dzhibladze T. G., Karapetjan N. V.:** Aftereffects of high temperatures on the kinetics of variable and delayed fluorescence in leaves (in Russian). Fiziol. Rast., 34, 435–444, 1987.
21. **Burza W., Murkowski A., Malepszy S.:** Differences in the luminescence of regenerated cucumber plants caused by plant hormones in the medium. Gartenbauwissenschaft, 59 (3), 105-108, 1994.
22. **Castelli F., Contillo R., Miceli F.:** Non-destructive determination of leaf chlorophyll content in four crop species. J. Agron. Crop Sci., 177, 275-283, 1996.
23. **Castrillo M., Calcalgno A. M.:** Effects of water stress and rewatering on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity, chlorophyll and protein content in two cultivars of tomato. J. Hort. Sci., 64, 717-724, 1989.
24. **Chmielewski A. G., Iller E., Tymiński B.:** Technologia oczyszczania gazów odlotowych wykorzys-tująca energię wiązki elektronów – możliwości rolniczego wykorzystania produktu ubocznego. Folia Univ. Agric. Stetin. 204 Agricultura (81), 175-180, 2000.
25. **Cohen A. S., Popovic R. B., Zalik S.:** Effect of polyamines on chlorophyll and protein content photochemical activity and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. Plant Physiol., 64, 717-720, 1979.
26. **Cornic G., Briantais J. M.:** Partitioning of photosynthetic electron flow between CO_2 and O_2 reduction in a C3 leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO_2 concentrations and during drought stress. Planta, 183, 178-184, 1991.
27. **Critchley C.:** The molecular mechanism of photoinhibition – facts and fiction. Aust. J. Plant Physiol., 15, 27-41, 1988.
28. **Critchley C., Russell A. W., Bolhàr-Nordenkampf H. R.:** Rapid protein turnover in photosystem 2. Fundamental flaw or regulatory mechanism? Photosynthetica, 27 (1-2), 183-190, 1992.
29. **Croxdale J.G., Omasa K.:** Chlorophyll *a* fluorescence and carbon assimilation in developing leaves of light-grown cucumber. Plant Physiol., 93, 1078-1082, 1990.
30. **Czarnowski M.:** Promieniowanie fotosyntetycznie czynne. Wiad. Bot., 27(4), 271-288, 1983.
31. **Czarnowski M.:** Spektralna wydajność fotosyntezy roślin wyższych. Wiad. Bot., 28(1), 9-26, 1984.
32. **Czarnowski M.:** Important measure units and symbols used in plant physiology. Acta Physiol. Plant., 18(2), 173-181, 1996.
33. **Czerpak R., Bajguz A.:** Aktywność fizjologiczno-biochemiczna poliamin w adaptacji roślin do stresów. Post. Biol. Komórki, 26 (3), 523-538, 1999.
34. **Daniel E.:** The temperature dependence of photoinhibition in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.). Plant Sci., 124, 1–8, 1997.
35. **Dekker J.:** A temporal phase mutation of chlorophyll fluorescence in triazine-resistant *Brassica napus*. Z. Naturforsch., 42c, 775-778, 1987.

36. **Devine M., Duke S. O., Fedtke C.:** Physiology of herbicide action. PTR Prentice Hall Englewood Cliffs, New Jersey, 1993.
37. **Devlin R.M., Zbieć I., Murkowski A., Karczmarczyk S.:** The use of post-luminescence decay and fluorescence emission to detect of initial herbicide toxicity. Weed Res., 21, 271-274, 1980.
38. **Devlin R.M., Murkowski A., Zbieć I., Karczmarczyk S., Skórska E.:** Influence of buthidazole, diuron and atrazine on some light reactions of photosynthesis. Weed Sci., 31, 879-883, 1983.
39. **Dexter S., Tottingham W., Graber L.:** Investigation of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity. Plant Physiol.,7, 721-726, 1932.
40. **Dobek A.:** Fotosynteza, W: Biospektroskopia t. 2 (red. J. Twardowski). PWN, Warszawa, 129-169, 1989.
41. **Drolet G., Dumbroff E. B., Legge L. R., Thompson J. E.:** Radical scavenging properties of polyamines. Phytochemistry, 25 (2), 367-371, 1986.
42. **Ducruet J. M., Lemoine Y.:** Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine- resistant biotypes from different plant species. Plant Cell Physiol., 26, 419-429, 1985.
43. **Erickson J. M., Rahire M. Bennoun P., Delepelaire P., Diner B., Rochaix J., D.:** Herbicide resistance in *Chlamydomonas reinhardtii* results from a mutation in the chloroplast gene for the 32–kilodalton protein of photosystem II, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3617-3621, 1984.
44. **Etienne A. L., Kirilovsky D.:** Comparison of the primary events of photoinhibition in *Cyanobacteria*, green algae and thylakoids of higher plants. Photosynthetica, 27 (1-2), 81-87, 1992.
45. **Fedtke C.:** Biochemistry and physiology of herbicide action. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1982.
46. **Floryszak-Wieczorek J., Murkowski A., Kubiś J., Krzywański Z.:** The effect of spermidine on chlorophyll luminescence in wheat leaves under water stress. Acta Physiol. Plant. 14 (3),119-126, 1992.
47. **Foyer C. H., Lelandais M., Kunert K. J.:** Photooxidative stress in plants. Physiol. Plant., 92, 696-717, 1994.
48. **Forcella F.:** Herbicide resistant crops: yield penalties and weed thresholds for oilseed rape. Weed Res., 27, 31-34, 1987.
49. **Galston A. W., Sawhney R. K.:** Polyamines in plant physiology. Plant Physiol., 94, 406-410, 1990.
50. **Genty B., Briantais J. M., Baker N. R.:** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta, 990, 87-92, 1989.
51. **Gimenez C., Mitchel V. J., Lawlor D. W.:** Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. Plant Physiol., 98, 516-524, 1992.
52. **Godzik B.:** Surface ozone concentrations in southern Poland: tobacco cultivar exposure study. Fragm. Flor. Geobot., 42(1), 161-172, 1997.

53. **Govindjee, Downton W. J. S., Fork D. C., Armond P. A.:** Chlorophyll *a* fluorescence transient as an indicator of water potential of leaves. Plant Sci. Lett., 20, 191-194, 1981.
54. **Grzebisz W., Fotyma E.:** Ocena odżywiania siarką rzepaku uprawianego w północno-zachodniej Polsce. Rośliny oleiste, 17, 275-280, 1996.
55. **Gutteridge J. M., Halliwell B.:** The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem. Sci., 15(4), 129-135, 1990.
56. **Gwóźdź E., A.:** Molekularne podstawy odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. W: Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie (Red. J. Barciszewski, K. Łastowski, T. Twardowski). Sorus, Poznań, 469-492, 1996.
57. **Hall D. O., Rao K. K.:** Fotosynteza (tł. Photosynthesis). WNT, Warszawa, 1999.
58. **Haneklaus S., Borchers S., Schnug E.:** Relationship between sulphur and glutathione concentration in vegetative tissue of oilseed rape. In.: IX Inter. Rapessed Congress, 4-7.07.1995, Cambridge U. K., 1, 293-295, 1995.
59. **Haneklaus S., Bloem E., Schnug E.:** Sulphur in agroecosystems. Fol. Univ. Agric. Stetin., 204 Agricultura (81), 17-32, 2000.
60. **Havaux M., Lannoye R.:** Chlorophyll fluorescence induction: a sensitive indicator of water stress in maize plants. Irrigation Sci., 4, 147-151, 1983.
61. **Havaux M., Lannoye R.:** Effects of chilling temperatures on prompt and delayed chlorophyll fluorescence in maize and barley leaves. Photosynthetica, 18 (1), 117-127, 1984.
62. **Havaux M.:** Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. Plant Physiol., 100, 424-432, 1992.
63. **Havaux M., Niyogi K. K.:** The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more then one mechanism. Plant Biol., 96(15), 8762-8767, 1999.
64. **Havir E. A., McHalle N.A.:** Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO_2. Plant Physiol., 89, 952-957, 1989.
65. **Heggestad H., E.:** Origin of Bel-W3, Bel-C, Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. Environ. Pollut., 74, 264-291, 1991.
66. **Hendrich W.:** Response of the photosynthetic apparatus to the excess light intensity. Acta Physiol. Plant., 17(2), 153-165, 1995.
67. **Hideg E., Demeter S.:** Comparison of the decay of slow delayed luminescence in triazine-susceptible and -resistant biotypes of *Erigeron canadensis* L. FEBS Lett., 200(1), 139-143, 1986.
68. **Hideg E., Demeter S.:** Effect of pH on the slow phase components of delayed luminescence in chloroplasts. Z. Naturforsch., 42c, 1121-1125, 1987.
69. **Hideg E., Scott R. Q., Inaba H.:** Spectral resolution of long term (0,5-50 s) delayed fluorescence from spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys., 285(2), 371-372, 1991.
70. **Hippeli S., Elstner E. F.:** Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants. J. Plant Physiol., 148, 249-257, 1996.
71. **Hirschberg J. Bleecker A., Kyle D., McIntosh L.:** The molecular basis of triazine- herbicide resistance in higher- plant chloroplasts. Z. Naturforsch., 39c, 412-420, 1984.

72. **Huner N. P. A., Maxwell D. P., Gray G. R., Savitch L. V., Krol M., Ivanov A. G., Falk S.:** Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: Redox state of photosystem II. Physiol. Plant., 98, 358-364, 1996.
73. **Innes W. B.:** Effect of nitrogen oxide emissions on ozone levels in metropolitan regions. Environ. Sci. Technol., 15(8), 904-911, 1981.
74. **Janowiak F., Dörffling K.:** The role of abscisic acid in chilling tolerance of maize seedlings. W: Inter. Sci. Meeting Ecophysiological aspect of plant responses to stress factors. Grzesiak *et all* (ed.), PAN Kraków, 33-39, 1998.
75. **Jun S. S., Kim J. M., Moon B. Y., Lee C. B.:** The effect of chilling treatment on photosynthesis and identification of its lesion sites in cucumber. W: Mathis P. (ed.): Photosynthesis: from light to biosphere. Vol. 4, Kluver Academic Publishers, The Netherlands, 845-848, 1995.
76. **Jung S., Steffen K. L.:** Influence of photosynthetic photon flux densities before and during long-term chilling on xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence quenching in leaves of tomato (*Lycopersicon hirsutum*). Physiol. Plant., 100, 958-966, 1997.
77. **Jursinic P. A.:** Delayed fluorescence: current concepts and status. In: Govindjee, Amesz J., Fork D. C., eds. Light Emission by Plant and Bacteria. Academic Press, New York, 291-328, 1986.
78. **Kacperska A.:** Reakcje roślin na czynniki stresowe. W: Podstawy fizjologii roślin (Red. J. Kopcewicz i St. Lewak), PWN, Warszawa, 575-633, 1998a.
79. **Kacperska A.:** Plant responses to low temperature stress signaling pathways involved. In: Crop development for the cool and wet regions of Europe, COST 814-II (Eds P. Sowiński i in.) Luxembourg, 133-146, 1998b.
80. **Keiller D. R., Walker D. A.:** The use of chlorophyll fluorescence to predict CO_2 fixation during photosynthetic oscillations. Proc. R. Soc. Lond., B, 241, 59-64, 1990.
81. **Kislyuk L. M., Bubolo L. S., Paleeva T. V.:** Heat shock effects on primary thermostability and reparability of photosynthesis and on the ultrastructure of mesophyll cells in strawberry *Fragaria vesca* L (in Russian). Plant Physiol., 39 (5), 939–948, 1992.
82. **Kleier D. A., Andrea T. A., Hegedus J. K. J., Gardner, Cohen B.:** The topology of 32 kDa herbicide binding protein of photosystem II in the thylakoid membrane. Z. Naturforsch., 42c, 733-738, 1987.
83. **Koźmiński C., Czarnecka M.:** Klimat miasta Szczecina i okolicy. W: Stan środowiska miasta i rejonu Szczecina. ESOFT Szczecin, 1993.
84. **Kratsch H., Wise R. R.:** The ultrastructure of chilling stress. Plant, Cell Environ., 23, 337-350, 2000.
85. **Krause G. H., Somersalo S.:** Fluorescence as a tool in photosynthesis research: application in studies of photoinhibition, cold acclimation and freezing stress. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 323, 281-293, 1989.

86. **Krause G. H., Somersalo S., Zumbusch E., Weyers B., Laasch H.:** On the mechanism of photoinhibition in chloroplasts relationship between changes in fluorescence and activity of photosystem II. J. Plant Physiol., 136, 472-479, 1990.

87. **Krause G. H., Weis E.:** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42, 313-349, 1991.

88. **Krauze A., Bowszys T.:** Wpływ stosowania różnych technologii nawozów siarkowych na plonowanie i jakość rzepaku ozimego i jarego. Folia Univ. Agric. Stetin. 204 Agricultura, (81), 133-142, 2000.

89. **Kruk J., Strzałka K.:** Funkcja i mechanizm działania plastochinonu w błonach fotosyntetycznych. Post. Biol. Komórki, 22(5), 89-98, 1995.

90. **Krupa Z., Baszyński T.:** Environmental stresses as factors modifying the structure of the light- harvesting chlorophyll a/b protein complex II. Photosynthetica, 23, 695-698, 1989.

91. **Krupa S. V., Manning W. J., Nosal M.:** Use of tobacco cultivars as biological indicators of ambient ozone pollution: an analysis of exposure-response. Environ. Pollut., 81, 137-146, 1993.

92. **Kubiś J., Bandurska H.:** Zmiany zawartości poliamin w liściach dwóch genotypów jęczmienia w warunkach stresu wodnego. W: Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych. Edytorzy: St. Grzesiak, A. Skoczowski, Z. Miszalski, ZFR PAN Kraków, 209-212, 1998.

93. **Kuropatwa R., Nauš J. Mašláň M., Dvořák L.:** Basic properties of the chlorophyll fluorescence temperature curve in barley leaves. Photosynthetica, 27 (1-2), 129-138, 1992.

94. **Kutik J., Cincerova A., Dvorak M.:** Chloroplast ultrastruktural development during the ontogeny of the second leaf of wheat under nitrogen deficiency. Photosynthetica, 28, 447-453, 1993.

95. **Kyle O. I., Ohad J., Arntzen C. I.:** Membrane protein damage and repair. Selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4070-4074, 1984.

96. **Kyle D. J.:** The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II. In: Topics in photosynthesis, t. 9. (Ed. Barber J.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 197-226, 1987.

97. **Lazár D.:** Chlorophyll *a* fluorescence induction. Biochim. Biophys. Acta, 1412, 1-28, 1999.

98. **Lemoine Y., Dubacq J. P., Zabulon G., Ducruet J. M.:** Organization of the photosynthetic apparatus from triazine-resistant and -susceptible biotypes of several plant species. Can. J. Bot., 64, 2999–3007, 1986.

99. **Levitt J.:** Responses of Plants to Environmental Stresses. Acad. Press, New York and London, 82-89, 1972.

100. **Lichtenthaler H. K., Rinderle U.:** The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. Critic. Rev. Anal. Chem., 19 (1), 29-85, 1988.

101. **Lichtenthaler H. K.:** Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. J. Plant Physiol., 148, 4-14, 1996.

102. **Long S. P., Baker N. R., Raines C. A.:** Analysing the responses of photosynthetic CO_2 assimilation to long- term elevation of atmospheric CO_2 concentration. Vegetatio, 104/105, 33-45, 1993.

103. **Lorenc-Plucińska G., Byczyńska A.:** Reakcje roślin na spaliny samochodowe. W. Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych. (Red. S. Grzesiak i in.), Zakł. Fizjol. Roślin. PAN, Kraków, 41-49, 1998.

104. **Łata B.:** Mechanizmy chroniące roślinę przed stresem oksydacyjnym, wywołanym niekorzystnymi warunkami środowiska. Post. Nauk Roln., 6, 115-132, 1998.

105. **Maciorowski R., Piech M., Stankowski S., Murkowski A.:** Fluorescencja chlorofilu jako szybki test do badania reakcji pszenżyta ozimego na herbicydy mocznikowe. Fragm. Agron., 1, 61-69, 1996.

106. **Marska E., Wróbel J.:** Znaczenie siarki dla roślin uprawnych. Folia Univ. Agric. Stetin., 204, Agricultura (81), 69-76, 2000.

107. **McGuire G. M.:** Genetic variation in simazine tolerance of a *Brassica campestris* population. Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań 11-14.05. 1987, Vol. 2, 469-470, 1987.

108. **Mel'nikov N. N., Novožilov K. V., Belan S. R., Pylova T. N.:** Spravočnik po pesticidam. Chimija, Moskva, 1985.

109. **Mengel K., Kirkby E. A.:** Podstawy żywienia roślin. (przekład z języka angielskiego pod red. S. Gumińskiego i M. Fotymy), PWRiL Warszawa, 1983.

110. **Monje O., S., Bugbee B.:** Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. Hort Sci., 27(1), 69-71, 1992.

111. **Mostowska A., Gwóźdź E. A.:** Reakcje aparatu fotosyntetycznego na stres oksydacyjny. Post. Biol. Komórki, 22(1), 43-63, 1995.

112. **Murkowski A.:** Use of standard radiometric systems in the study of herbicides action on the photosynthetic luminescence of cultivable plants and the weeds. Proc. of the Research Institute of Pomology, Skierniewice, Poland Ser. E, 3, 595-603, 1973.

113. **Murkowski A.:** Photosynthetic luminescence assay for determination of triazine resistance of rape plants. Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań 11-14.05. 1987, Vol. 4, 830-836, 1987.

114. **Murkowski A.:** Comparison of the delayed luminescence in triazine susceptible and resistant biotypes of *Brassica napus*. Cruciferae Newsletter, 13, 119, 1988.

115. **Murkowski A.:** Wpływ symazyny na fotosyntezę roślin odpornej i wrażliwej odmiany rzepaku. Zesz. Probl. IHAR - Wyniki badań nad rzepakiem ozimym w 1988, cz. II, IHAR Radzików k/Warszawy, 203-206, 1989.

116. **Murkowski A., Skórska E.:** Sposób określania chłodoodporności roślin uprawnych. PATENT nr 149 391, 1990.

117. **Murkowski A., Skórska E.:** Ocena wrażliwości pszenżyta na herbicydy triazynowe. Zesz. Nauk. AR w Szczecinie, 162, 179-183, 1994.

118. **Murkowski A.:** Biofizyczne metody badania fotosyntezy roślin rzepaku odpornych na herbicydy triazynowe. Rośliny Oleiste, 16(1), 127–134, 1995a.

119. **Murkowski A.:** Sposób oceny odporności roślin na suszę. Nr zgłoszenia 292470. PATENT nr 166857, 1995b.

120. **Murkowski A.:** Luminescence assay for determination of triazine resistance of rape plants. Proc. 2nd Inter. Weed Control Congress, 2, 541-545, 1996a.

121. **Murkowski A.:** Zastosowanie testu luminescencyjnego do określenia triazynoodporności w różnych genotypach rzepaku. Rośliny Oleiste, 17(1), 281–285, 1996b.

122. **Murkowski A.:** Wpływ deficytu dwutlenku węgla na pierwotne reakcje fotosyntezy. Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych. Praca zbiorowa pod red. S. Grzesiaka, Zakł. Fizjol. Roślin, PAN, Kraków, 517-522, 1996c.

123. **Murkowski A., Skórska E.:** Chlorophyll *a* luminescence an index of photoinhibition damages. Curr. Top. Biophys., 21(1), 72-78, 1997.

124. **Murkowski A., Stankowski S.:** Wpływ stosowania produktu z usuwania SO_2 i NO_x z gazów odlotowych przy użyciu wiązki elektronów na fotosyntezę roślin rzepaku ozimego. Mat. Konf. Naukowo-Technicznej „Gospodarcze wykorzystanie popiołów i gipsu z energetyki", Międzyzdroje, 6-7.11.1997, 127-134, 1997.

125. **Murkowski A.:** Wpływ wysokiej temperatury na fluorescencję chlorofilu w liściach roślin pomidora. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 469, 55-61, 1999a.

126. **Murkowski A.:** Badanie termowrażliwości roślin rzepaku. Rośliny Oleiste, 20(2), 387-394, 1999b.

127. **Murkowski A.:** Wpływ różnych form nawożenia azotowego i azotowo-siarkowego na pierwotne reakcje fotosyntezy i wskaźniki biometryczne młodych roślin rzepaku ozimego. Rośliny Oleiste, 20(1), 131-142, 1999c.

128. **Murkowski A., Burza W., Skórska E.:** Comparison of fluorescence in cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves of plants derived from in vitro regeneration system and from seeds. Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci., Vol. 48 (1), 37-40, 2000.

129. **Murkowski A.:** Heat stress and spermidine: effect on chlorophyll fluorescence in tomato plants. Biol. Plant., 44(1), 53-57, 2001.

130. **Neuner G., Larcher W.:** Determination of differences in chilling susceptibility of two soybean varieties by means of *in vivo* chlorophyll fluorescence measurements. J. Agron. Crop Sci. 164, 73-80, 1990.

131. **Niedźwiecki E., Stankowski S., Murkowski A., Malinowski R.:** Wstępne badania przydatności nawozowej produktu w postaci siarczanu amonu i saletry amonowej z odsiarczania i odazotowania spalin kotłowych pod uprawę kukurydzy. Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura, (81), 203-210, 2000.

132. **Niklas A., Butowt R., Jażdżewska E., Majewska-Sawka A.:** Poliaminy w komórce roślinnej: synteza, mechanizmy działania i funkcje. Post. Biol. Komórki, 25 (1), 33-49, 1998.

133. **Obrębska-Starklowa B.:** Wybrane problemy adaptacji ekosystemów i systemów społeczno-gospodarczych do współczesnych zmian klimatu. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 469, 69-78, 1999.

134. **Ort D. R., Ahrens W. H., Bjorn M., Stoller E. W.:** Comparison of photosynthetic performance in triazine – resistant and susceptible biotypes of *Amaranthus hybridus*. Plant Physiol., 72, 925-930, 1983.

135. **Ort D. R., Govindjee:** Obščie predstawlenija o preobrazowanii ènergii pri fotosinteze. W: Fotosintez, I (red. Govindjee), Mir, Moskwa, 8-89, 1987.

136. **Öquist G., Huner N.P.A.:** Effects of cold acclimation on the susceptibility of photosynthesis in Scots pine and in winter and spring cereals: a fluorescence analysis. Functional Ecol., 5, 91-100, 1991.

137. **Palta J. P., Li P. H.:** Cell membrane properties in relation to freezing injury. W: Plant Cold Hardiness and Freezing Stress (Eds P. H. Li, A. Sakai). Acad. Press, New York, San Francisco, London, 93-115, 1978.

138. **Peeler T. C., Naylor A. W.:** A comparison of the effects of chilling on thylakoid electron transfer in pea (*Pisum sativum* L) and cucumber (*Cucumis sativus* L). Plant Physiol., 86, 147-151, 1988.

139. **Peltonen J., Virtanen A., Haggren E.:** Using a Chlorophyll Meter to optimize fertilizer application for intensively-managed small-grain cereals. J. Agron. Crop Sci., 174, 309- 318, 1995.

140. **Pfister K., Arntzen C.:** The mode of action of photosystem II- specific inhibitors in herbicide- resistant weed biotypes. Z. Naturforsch., 34c, 996-1009, 1979.

141. **Pfister K., Radosevich S. R., Arntzen C.:** Modification of herbicide binding to photosystem II in two biotypes of *Senecio vulgaris* L. Plant Physiol., 64, 995-999, 1979.

142. **Piekielek W. P., Fox R. H.:** Use of Chlorophyll Meter to predict sidedress nitrogen requirements for maize. Agron., J., 84, 59-65, 1992.

143. **Pietkiewicz S., Łoboda T., Hołownia R., Nalborczyk E.:** Wpływ zróżnicowanego nawożenia azotem i stosowanie retardanta na wymianę gazową roślin pszenżyta ozimego odmiany Presto w warunkach stresu hydro- termicznego. Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych. Praca zbiorowa pod red. S. Grzesiaka i in., Zakład Fizjologii Roślin, PAN, Kraków, 297-298, 1998.

144. **Porankiewicz J., Gwóźdź E. A.:** Białka szoku termicznego i ich rola w komórkach roślinnych. Post. Biol. Komórki, 20 (2), 155–170, 1993.

145. **Pospíšil P., Skotnica J., Nauš J.:** Low and high temperature dependence of minimum F_0 and maximum F_m chlorophyll fluorescence *in vivo*. Bioch. Biophys. Acta, 1363, 95–99, 1998.

146. **Pölös E., Laskay G., Szigeti Z., Pataki Sz., Lehoczki E.:** Photosynthetic properties and cross- resistant *Conyza canadensis* Cronq (L.). Z. Naturforsch., 42c, 783-793, 1987.

147. **Putwain P. D., Mortimer A. M.:** The resistance of weed to herbicides: rational approaches for containment of growing problem. Brighton Crop Protection, Weeds, 285-294, 1989.

148. **Renard M., Bregeton M., Regnault Y.:** Selection and experiments on triazine resistant rapeseed lines. Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań 11-14.05. 1987, Vol. 2, 468, 1987.

149. **Richter M., Bothin B., Wild A.:** The differential effect of photoinhibition on the quantum yield of oxygen evolution and on the electron transport capacity studied with isolated spinach thylakoids. Photosynthetica, 27 (1-2), 191-200, 1992.

150. **Rutherford A. W., Inoue Y.:** Oscillation of the light luminescence from PSII: recombination of $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$. FEBS Lett., Vol. 165 (2), 165-170, 1984.

151. **Salin M. L.:** Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. Physiol. Plant., 72, 681-689, 1987.

152. **Salter A. H., Virgin I., Hagman A., Andersson B.:** On the molecular mechanism of light-induced D1 protein degradation in photosystem II core particles. Biochemistry, 31, 3990-3998, 1992.

153. **Santarius K. A., Exner M., Trebut-Lassale R.:** Effects of high temperature on the photosynthetic apparatus in isolated mesophyll protoplasts of *Valerianella lacusta* (L.) Betcke. Photosynthetica, 25, 17–26, 1991.

154. **Sączyńska V.:** Molekularny mechanizm fotoinhibicji. Post. Biol. Komórki, 20(1), 45-65, 1993.

155. **Schapendonk A. H. C. M., Van der Putten P. E. L., Dolstra O., Tonk W. I. M.:** Chlorophyll fluorescence: a non-destructive method for detecting damage in the photosynthetic apparatus in plants. Acta Hort., 304, 61-70, 1992.

156. **Schnug E.:** Sulphur nutritional status of European crops and consequences for agriculture. Sulphur in Agriculture, 15, 7-12, 1991.

157. **Schnug E., Haneklaus S.:** Physiological backgrounds of different sulphur utilisation in *Brassica napus* varieties. W.: Aspects of Applied Biology, 34, 235-264, 1993.

158. **Schreiber U., Berry J. A.:** Heat-induced change of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with the damage of the photosynthetic apparatus. Planta, 136, 233–238, 1977.

159. **Schreiber U., Bilger W., Neubauer C.:** Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Ecophysiology of photosynthesis (eds. Schulze E. D. and Caldwell M. M.), Ecological Studies, 100, 49-70, 1994.

160. **Schreiber U.:** Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion. Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany, 1997.

161. **Seaton G.G.R., Walker D.A.:** Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. Proc. R. Soc. Lond., B, 242, 29-35, 1990.

162. **Seeman J. R., Berry J. A., Downton W.J.S.:** Photosynthetic response and adaptation to high temperature in desert plants. A comparison of gas exchange and fluorescence methods for studies of thermal tolerance. Plant Physiol., 75, 364-368, 1984.

163. **Seidler M., Gawliński S., Goźliński H.:** Siarka w organizmach roślin wyższych. W: Siarka w biosferze. Praca zbior. pod red. J. Siuty i M. Rejman-Czajkowskiej, 168-193, 1980.

164. **Shen J.R., Terashima I. Katoh S.:** Cause for dark, chilling – induced inactivation of photosynthetic oxygen – evolving system in cucumber leaves. Plant Physiol., 93, 1354-1357, 1990.

165. **Skórska E., Murkowski A.:** Photosynthetic luminescence detection as the quick test of chilling resistance of cucumber plants. Hod. Rośl., Aklimat. Nasien., 32 (1/2), 285-289, 1988.

166. **Skórska E.:** Reakcja wybranych roślin uprawnych na promieniowanie UV-B. Rozprawy, nr 192. Akademia Rolnicza w Szczecinie. Szczecin, 2000.

167. **Slocum R.D., Kaur-Sawhney R., Galston A.W.:** The physiology and biochemistry of polyamines in higher plants. Arch. Biochem. Biophys., 235, 283-303, 1984.

168. **Sławiński J., Grabikowski E., Murkowski A.:** Kwantometryczna aparatura do rejestracji ultrasłabych świeceń biologicznych i możliwości zastosowania jej w rolnictwie i przemyśle spożywczym. Zesz. Nauk. WSR w Szczecinie, 37, 301-317, 1971.

169. **Sławiński J.:** Metody badania słabych emisji fotonowych z układów biologicznych. W: Biospektroskopia t. 3 (Pod red. J. Twardowskiego), PWN, Warszawa, 107-214, 1989.

170. **Smillie R. M., Hetherington S. E., Jie He, Nott R.:** Photoinhibition at chilling temperatures. Aust. J. Plant Physiol., 15, 207-222, 1988.

171. **Sowiński P., Parys E., Dembiński E., Falfus J., Romanowska E., Ślaski J.:** Rośliny w zmieniającym się klimacie: efekt szklarniowy. Wiad. Bot., 35(3-4), 17-34, 1991.

172. **Stanek R.:** Effect of ions on the photosystem II photoinhibition of triazine resistant and susceptible plants of *Erigeron canadensis* L. Acta Physiol. Plant., 13(3), 211-214, 1991.

173. **Stanek R.:** Effect of solar irradiation on the features of photosynthetic apparatus and on the growth of triazine susceptible and resistant biotypes of *Erigeron canadensis* L. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 405, 163–167, 1994.

174. **Stankowski S., Murkowski A., Niedźwiecki E., Malinowski R.:** Wpływ produktu z oczyszczania spalin z SO_2 i NO_X na właściwości gleby oraz wzrost i skład chemiczny pszenicy. Fol. Univ. Agric. Stetin., 190, Agricultura (72), 283-288, 1998.

175. **Starck Z., Cieśla E.:** Possible role of growth regulators in adaptation to heat stress affecting partitioning of photosynthates in tomato plants. Acta Soc. Bot. Pol., 58 (1), 71–84, 1989.

176. **Starck Z., Ważynska Z., Kucewicz O.:** Comparative effects of heat stress on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tomato plants with source-sink modulated by growth regulators. Acta Physiol. Plant., 16 (2): 125–133, 1993.

177. **Starck Z., Choluj D., Kalaji H.M.:** Photosynthesis and biomass allocation as response to chilling tomato plants. In: Dörffling *et al.* (Eds.): Crop adaptation to cool climates. COST 814 Workshop, Brussels-Luxembourg, 125-132, 1994.

178. **Starck Z.:** Stresy klimatyczne. W: Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska (Red. Z. Starck, D. Chołuj, B. Niemyska). Wyd. SGGW Warszawa, 7-94, 1995.

179. **Starck Z.:** Reakcja roślin na multistresowe warunki środowiska w aspekcie produkcji i dystrybucji masy. W. Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych. (Red. St. Grzesiak i in.), Zakł. Fizjol. Roślin. PAN, Kraków, 21-31, 1998.

180. **Starck Z., Choluj D., Gawrońska H.:** The effect of drought hardening in chilling on ABA content in xylem sap and ABA-delivery rate from root of tomato plant. Acta Physiol. Plant., 20(1), 41-48, 1998.

181. **Starzecki W., Libik A., Szubski J.:** Dokarmianie roślin dwutlenkiem węgla w uprawach szklarniowych. Owoce, warzywa i kwiaty, 18, 18-19, 1995.

182. **Strzałka K.:** Fotosynteza i chemosynteza. W: Podstawy fizjologii roślin (Red. J. Kopcewicz i St. Lewak) PWN, Warszawa, 229-284, 1998.

183. **Stryer L.:** Fotosynteza. W: Biochemia. PWN, Warszawa, 696-728, 1997.

184. **Tarusov B.N., Veselovsky V.A.:** Ultraweak luminescence from plants and its application (in Russian). Moscow State Publ. House, Moscow, 1978.

185. **Terzaghi W.B., Fork D.C., Berry J.A., Field C.B.:** Low and high temperature limits to PSII. - Plant Physiol., 91, 1494–1500, 1989.

186. **Thebut R., Santarius K.A.:** Effects of high temperature stress on various biomembranes of leaf cell *in situ* and *in vitro*. Plant Physiol., 70, 200–205, 1982.

187. **Tognini M., Ranieri A., Castagna A., Nali C., Lorenzini G., Soldatini G.:** Ozone - induced alteration in thylakoid protein patterns in pumpkin leaves of different age. Phyton., 37(3), 277-282, 1997.

188. **Trebst A.:** The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. Z. Naturforsch., 42c, 742-750, 1987.

189. **Trissl H. W., Gao Y., Wulf K.:** Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential equations describing the primary photochemistry of photosystem II by an exciton-radical pair equilibrium. Biophys. J., 64, 974-988, 1993.

190. **van Kooten O., Snel J.F.H.:** The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynth. Res., 25, 147-150, 1990.

191. **Venema J.H., Kok B.H., van Hasselt P.R.:** Effects of sub-optimal temperature on growth, leaf pigments and photosynthesis of *Lycopersicon* species of different chilling sensitivity. In: Sowiński *et al.* (Eds.): Crop development for the cool and wet regions of Europe. COST 814 Workshop, Luxemburg: 76-82, 1997.

192. **Veselova T.V., Veselovsky V.A., Chernavsky D.S.:** Plants and stress (in Russian). Moscow State Publ. House, Moscow, 1993.

193. **Veselovsky V.A., Veselova T.V.:** Luminescence of plants (in Russian). Publishing House "Science", Moscow, 1990.

194. **Vierling E.:** The roles of heat shock protein in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42, 579–620, 1991.

195. **Voss M., Renger G., Kötter C., Gräger P.:** Fluorometric detection of photosystem II herbicide penetration and detoxification in whole leaves. Weed Sci., 32, 675-680, 1984.

196. **Weinstein D.A., Yanai R.D.:** Integrating the effects of simultaneous multiple stresses on plants using the simulation model TREGRO. J. Environ. Qual., 23, 418-428, 1994.

197. **Więckowski S., Waloszek A.:** Resistance of chlorophylls and carotenoids against photobleaching at different phases of chloroplast biogenesis. Acta Physiol. Plant., 17(2), 199-206, 1995.

198. **Wildner G.F., Heisterkamp U., Trebst A.:** Herbicide cross – resistance and mutation of the *psb*A gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Z. Naturforsch., 45c, 1142-1150, 1990.

8. STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono przykłady zastosowania metod luminescencyjnych uzupełnionych innymi metodami instrumentalnymi do oceny reakcji roślin na niesprzyjające czynniki środowiska: chłód i światło, podwyższoną temperaturę, deficyt wody, niedobór azotu, herbicydy inhibitujące proces fotosyntezy oraz czynniki fotooksydacyjne. Spośród metod luminescencyjnych stosowano: indukcję fluorescencji chlorofilu, system PAM, termogramy oraz fotograficzną rejestrację fluorescencji chlorofilu. Wykonywano także pomiary opóźnionej luminescencji chlorofilu oraz ultrasłabej biochemiluminescencji tkanek roślinnych. Zarówno fluorescencja jak i opóźniona luminescencja chlorofilu są ściśle związane z reakcjami w fazie świetlnej fotosyntezy, a otrzymane parametry informują o wydajności tych reakcji. Badaniom poddano dziesięć gatunków roślin (kukurydza, pszenica, jęczmień, burak ćwikłowy, rzepak, tytoń, fasola, ogórek, pomidor, komosa) należących do 14 odmian lub rodów.

Wyniki prezentowanych badań potwierdziły tezę, że większość czynników stresowych negatywnie oddziałuje na przebieg procesu fotosyntezy i może uszkadzać aparat fotosyntetyczny. Wykorzystywane parametry luminescencji chlorofilu pozwoliły na szybką i wnikliwą ocenę zróżnicowanej wrażliwości na wysoką i niską temperaturę wybranych odmian pomidora oraz ogórka, zarówno przy niskim jak i wysokim poziomie ich napromieniowania. Zaproponowano prosty test luminescencyjny do oceny wrażliwości zbóż na dehydratację, a także wykazano ochronny wpływ egzogennie wprowadzonej spermidyny na przebieg reakcji fotosyntezy w warunkach silnego odwodnienia oraz po restytucji. Stwierdzono bardzo niekorzystny wpływ jednoczesnego oddziaływania na rośliny dwóch i więcej czynników stresowych. Detekcja opóźnionej luminescencji chlorofilu pozwoliła na ocenę fitotoksyczności środków chwastobójczych blokujących transport elektronów w aparacie fotosyntetycznym (herbicydów triazynowych, mocznikowych, diazynowych). Opracowana metoda pozwala w prosty i mało pracochłonny sposób określać wrażliwość zarówno ochranianych roślin, jak i chwastów na herbicydy - inhibitory fotosyntezy. Rośliny rzepaku rodu triazynoodpornego wykazały większą odporność na atrazynę i azyprotrynę w porównaniu z tradycyjnymi odmianami rzepaku, jednak okazały się bardziej wrażliwe na podwyższone napromieniowanie w zakresie PAR, oceniane poprzez pomiar indukcji fluorescencji chlorofilu.

Biowskaźnikowe rośliny tytoniu odmiany Bel-W3 wrażliwej na smog fotochemiczny, poddane ekspozycji na zanieczyszczone spalinami powietrze miejskie miały obniżone wartości parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu zanim jeszcze na liściach pojawiły się charakterystyczne nekrozy. Objawów takich nie stwierdzono w przypadku tolerancyjnej odmiany Bel-B, co można tłumaczyć większą (o ok. 40%) aktywnością enzymu antyoksydacyjnego – peroksydazy w liściach roślin tej odmiany.

Biorąc pod uwagę zalety prezentowanych metod luminescencyjnych i zestawów pomiarowych (w większości zaprojektowanych przez autora), wykazano ich przydatność w hodowli i ekofizjologii roślin, badaniach procesu fotosyntezy oraz w monitoringu ekologicznym.

Słowa kluczowe: czynniki stresowe, ekofizjologia roślin, fluorescencja chlorofilu, fotosynteza, rośliny uprawne.

9. SUMMARY

EFFECTS OF SOME STRESS FACTORS ON CHLOROPHYLL LUMINESCENCE IN THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS CROP PLANTS

The study presents application examples of luminescence methods, amended with other instrumental methods, for evaluation of plant responses to adverse environmental factors: chill and high light, high temperature, water deficit, nitrogen insufficiency, photosynthesis-inhibiting herbicides and photo-oxidation factors.

The luminescence methods applied in this study included chlorophyll fluorescence induction, PAM system, thermograms and photographic recording of chlorophyll fluorescence. Also delayed chlorophyll luminescence and ultraweak biochemiluminescence of plant tissue were measured. Both fluorescence and delayed luminescence of chlorophyll are closely related to light-phase reactions of photosynthesis, and the derived parameters inform about the efficiency of these reactions. The studies covered ten species of plants (maize, wheat, barley, red beet, oilseed rape, tobacco, bean, cucumber, tomato and pigweed) belonging to 14 cultivars or lines.

The results presented here confirmed that the majority of stress factors negatively affect the process of photosynthesis and may damage the structure of the photosynthetic apparatus. The applied luminescence parameters allowed

a fast and in-depth evaluation of varied susceptibility to high or low temperature of selected tomato and cucumber cultivars, both at low and high level of PAR. A simple luminescence test has been proposed for cereal plants evaluation towards their susceptibility to dehydration. A protective effect of exogenous sly introduced spermidine on the photosynthesis reactions under strong dehydration and after restitution was also demonstrated. A very negative effect of synergic action of two or more stress factors was found.

Chlorophyll delayed luminescence detection allowed an evaluation of phytotoxicity of herbicides that block the electron transport in the photosynthetic apparatus (triazine, urea, or diazine herbicides). The proposed luminescence method provides a simple and convenient way to determine the susceptibility of the plants - both those protected and the weeds - to photosynthesis-inhibiting herbicides. Triazine-resistant oilseed rape plants demonstrated generally higher resistance to the atrazine and azyprotrine in comparison with the conventional cultivars, however they appeared to be more susceptible to increased PAR, as measured with chlorophyll fluorescence induction.

Bio-indicative, sensitive to photochemical smog tobacco plants of cv. Bel-W3, while exposed to urban air polluted with combustion gases, showed decreased values of the chlorophyll fluorescence parameters, before the characteristic necroses appeared on the laves. Such symptoms were not observed in the plants of the tolerant cv. Bel-B, which can be explained with increased (by 40%) activity of an antioxidant enzyme – peroxidase in the leaves of this variety.

Bearing in mind the advantages of the presented luminescence methods and measuring sets (mostly designed by the author), their usefulness was showed in plant breeding, ecophysiology, photosynthesis research, as well as in ecological monitoring.

Keywords: chlorophyll fluorescence, crop plants, photosynthesis, stress factors, plant ecophysiology.

Adres Autora:

Antoni Murkowski
Zakład Fizyki, Akademia Rolnicza
ul. Papieża Pawła VI nr 3, 71- 459 Szczecin
tel. (091) 4250391
e-mail: fizyka@dedal.man.szczecin.pl